UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Triagem Fitoquímica e Farmacológica e Formulação de
Nanopartículas de Produtos Derivados de *Passiflora*
serratodigitata L.

Marc Strasser

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Tit. Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo
2011

Marc Strasser

Triagem Fitoquímica e Farmacológica e Formulação de
Nanopartículas de Produtos Derivados de *Passiflora serratodigitata*
L.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Tit. Elfriede Marianne Bacchi
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus avôs, Edwiges, Lourdes,
Charles e Henrique, *im memoriam*

AGRADECIMENTOS

À profa. Elfriede Marianne Bacchi, pela orientação deste trabalho, pelos valiosos ensinamentos e pelo carinho durante esses anos.

Aos professores Edna Tomiko Miyake Kato, Paulo Chanel Deodato de Freitas e Dominique Corrine Hermine Fischer, pelos ensinamentos em Farmacognosia.

À profa. Soraia Katia Pereira Costa e à sua aluna Juliana Florenzano, pela ajuda nos ensaios de atividade anti-inflamatória.

Aos professores Ingrid Elida Collantes Diaz e Massayoshi Yoshida, pela ajuda na identificação e isolamento de compostos químicos.

À profa. Silvia Berlanga de Moraes Bastos, pela utilização de seu laboratório nos ensaios de atividade antioxidante.

À profa. Nádia Araci Bou-Chacra, pelos ensinamentos e pela ajuda na caracterização de nanopartículas.

Ao técnico Roberto de Jesus Honório, pela ajuda em todos os ensaios.

Aos amigos do laboratório, Leandro, Peko, Thiago, Débora, Bruno, Alberto, Josseara, Harry, Flávia, pela amizade e apoio a este trabalho.

A todo o pessoal do Biotério de Animais do Conjunto Das Químicas, pelo excelente apoio nos ensaios de atividade antiúlcera.

Aos amigos da pós, Mariane, Francinalva, Marina, Rafinha, Rafael, Juliana, Felipe, Mário, Cris e Karin, pelo apoio dentro e fora da Faculdade.

À Republica dos Goleiros e aos meus times, pelo apoio moral e descontração.

Aos meus pais, Tânia e Gerard, pelo carinho, por minha formação moral e pelos ensinamentos durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos Thomas e Caroline, aos meus cunhados Sérgio e Leila e, em especial, ao meu sobrinho Thomé.

"Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is not to stop questioning" **Albert Einstein**

"Um país se faz com homens e com livros" **Monteiro Lobato**

RESUMO

Introdução: A família Passifloraceae se destaca dentre os principais grupos de plantas nativas utilizadas na medicina popular brasileira. Este trabalho descreve a química e farmacologia de *Passiflora serratodigitata* L. **Objetivos:** Determinar os principais grupos de substâncias ativas, quantificar flavonóides, estabelecer um perfil cromatográfico em cromatografia líquida (CLAE), estudar as atividades antiúlcera, anti-inflamatória e antioxidante do extrato bruto e frações de *Passiflora serratodigitata*, e comparar a atividade antiúlcera com uma formulação nanoencapsulada. **Material e Métodos:** Folha e caules secos de *P. serratodigitata* foram fornecidos pelo Instituto Agronômico de Campinas. O extrato bruto (EB) foi preparado por maceração seguida de percolação, e foi fracionado por partição líquido-líquido nas frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa. A triagem fitoquímica se direcionou para os principais grupos químicos relatado na família. O perfil cromatográfico para flavonóides foi realizado em cromatografia em camada delgada e CLAE. A quantificação de flavonóides foi determinada por espectrofotometria. As atividades anti-inflamatória e antiúlcera foram estudada em ratos Wistar. O modelo de úlcera aguda contou com lansoprazol como controle e os resultados foram analisados pelos softwares *ImageProPlus®* e *XLStat®*. A quantificação de flavonóides foi realizada em espectrofotômetro. A atividade antioxidante foi avaliada pela redução do DPPH. A formulação nanoparticulada foi caracterizada físico-quimicamente (tamanho de partícula, distribuição, potencial Zeta e eficiência de encapsulamento), e foi realizada uma comparação entre a atividade antiúlcera das nanopartículas com seus respectivos extratos não encapsulados. **Resultados:** A triagem fitoquímica revelou a presença de alcalóides, flavonóides e taninos. Os perfis cromatográficos apresentaram a presença de vários flavonóides, com predomínio na fração acetato de etila, e revelaram a presença de cinco compostos majoritários. Um destes compostos foi isolado, e apresentou estrutura semelhante ao neoflavonóide seratina, encontrada em literatura. A atividade anti-inflamatória apresentou resultado significativo apenas na dose de 400 mg/kg de EB, mas nenhum dos mediadores inflamatórios estudados foi inibido. A atividade antioxidante apresentou resultados satisfatórios, sendo a fração acetato de etila e o EB com atividade mais pronunciada, em convergência com a maior quantidade de flavonóides presentes nesses extratos. A atividade antiúlcera apresentou resultados extremamente significativos, com inibição total de úlcera para a fração acetato de etila, uma inibição superior a 70% para o EB e uma dose-dependência de inibição na fração aquosa. As nanopartículas formadas apresentaram distribuição unimodal de tamanho, potencial Zeta favorável e eficiência de encapsulamento superior a 80%. A atividade antiúlcera revelou proteção semelhante em doses dez vezes menores. **Conclusões:** *Passiflora serratodigitata* L. possui flavonóides, taninos e alcalóides. O perfil em CLAE acusou a presença de cinco compostos majoritários. O EB e as frações mais ricas em flavonóides apresentaram expressiva atividade gastroprotetora in vivo. As nanocápsulas apresentaram atividade semelhante em doses menores.

Palavras-chave: *Passiflora serratodigitata*, flavonóides, perfil cromatográficos, atividade antiúlcera, nanopartículas.

ABSTRACT

Introduction: The Passifloraceae family stands out among the main groups of native plants used in Brazilian folk medicine. This work describes chemical and pharmacological characterization of *Passiflora serratodigitata* L. **Objectives:** Determine the main groups of active substances, the total flavonoid content, establish a chromatographic profile in high performance liquid chromatography (HPLC), study the antiulcer, anti-inflammatory and antioxidant activities of the hydroalcoholic crude extract and its fractions of *Passiflora serratodigitata*, and compare the antiulcer activity with a nanoencapsulated formula. **Material & Methods:** Dried leaves and stem of *P. serratodigitata* were provided by Instituto Agrônomo de Campinas. The hydroalcoholic crude extract (HE) was prepared by maceration followed by percolation, and then it was fractioned by liquid-liquid extraction into hexane, dichloromethane, ethyl acetate and aqueous extracts. The phytochemical screening was directed to main groups presented in the family. The chromatographic profile for flavonoids was performed by thin-layer chromatography and HPLC. The flavonoid quantification was determined by spectrophotometry. The antiulcer activity was studied in Wistar rats for three different HE ethylacetate and aqueous fractions dosages, using lansoprazole as control. The ulcer was induced by an acidified ethanol solution (acute ulcer model), and the results were analyzed by the software *ImageProPlus*® and *XLStat*®. The flavonoid quantification was made by spectrophotometry. The anti-inflammatory activity was studied in Wistar rats. The antioxidant activity was studied by the DPPH method. Nanoparticle were physic-chemically characterized (size distribution, Zeta potential and encapsulation efficiency), and a comparison between nanoparticle and plant extracts' antiulcer activity was performed. **Results:** The phytochemical screening revealed the presence of alkaloids, flavonoids and tannins. The chromatographic profile showed the presence of various flavonoids. The HPLC assay showed a major presence of flavonoids in ethyl acetate and aqueous fractions, and revealed five main components, one of which was identified as similar to the neoflavonoid serratin. The antiulcer activity showed a protection of about 73% for all doses of HE and total protection for the ethyl acetate and aqueous extracts. The flavonoid quantification reported 12.9% of flavonoids in HE, 11,9% in the ethyl acetate fraction, and 3.8% in the residual water fraction. The anti-inflammatory activity showed significant results only for crude extract dose of 400 mg/kg, but none of the inflammation mediators studied were inhibited. For the antioxidant activity, results of EC50 for ethyl acetate fraction and crude extract were better when compared to residual water fraction, but not to Trolox®. The nanoparticle formulation originated nanocapsules with unimodal size distribution, negative zeta potential, and antiulcer activity in doses ten times lower. **Conclusions:** *Passiflora serratodigitata* L. contains alkaloids, tannins and flavonoids. The HPLC analysis determined the presence of five major flavonoids. The CE and its most flavonoid-rich fractions showed an expressive *in vivo* gastric mucosa protection against acidified ethanol induced lesion.

Keywords: *Passiflora serratodigitata*, flavonoids, chromatographic profile, antiulcer activity, nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Ramos floridos de <i>Passiflora serratodigitata</i> L. (Créditos: IAC – Soares-Scott, M.D.).....	3
FIGURA 2: Flavonóides encontrados em espécies de <i>Passiflora</i> L	7
FIGURA 3: Alcalóides β -carbolínicos encontrados em <i>Passiflora</i> L	8
FIGURA 4: Fracionamento, de acordo com práticas usuais do laboratório, do extrato hidroetanólico bruto liofilizado (60% v/v) de <i>Passiflora serratodigitata</i> L., obtendo-se as frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e aquosa	27
FIGURA 5: Reação de complexação de flavonóides com cloreto de alumínio, realizada na quantificação de flavonóides no extrato bruto e frações de <i>Passiflora serratodigitata</i> L.....	30
FIGURA 6: Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH) por compostos fenólicos (ROH)	32
FIGURA 7: Esquema do modelo de permeabilidade vascular (extravasamento plasmático) no ensaio de atividade anti-inflamatória do extrato bruto de <i>Passiflora serratodigitata</i> L.	34
FIGURA 8: Perfil cromatográfico com identificação para flavonóides realizado com produtos de <i>Passiflora serratodigitata</i> L. Fase móvel: Clorofórmio, acetona, ácido fórmico (75;16,5;8,5), fase estacionária: Silicagel G. A: Extrato bruto; B: Fração hexânica; C: Fração diclorometano; D: Fração acetato de etila; E: Fração aquosa; F: Padrão rutina. Visualização: UV 365 nm (direita), negativo da foto (esquerda). Os números na figura à esquerda referem-se às bandas representada na Tabela 9	41
FIGURA 9: Cromatograma em CLAE da fração acetato de etila de <i>P.serratadigitata</i> . Em 1, 2 e 3, estão representados a varredura de absorção em diferentes comprimentos de onda (acima) e o espectro de absorção em UV em 254 nm (abaixo) respectivamente dos picos 1, 2 e 3.Verificar condições cromatográficas no item 5.2	44

FIGURA 10: Cromatograma em CLAE da fração aquosa (detecção em 254 nm). Em 4 e 5 estão representados a varredura de absorção em diferentes comprimentos de onda (acima) e o espectro de absorção em UV em 254 nm (abaixo) de cada pico. Verificar as condições cromatográficas no item 5.2.....**45**

FIGURA 11: Cromatograma em CLAE da fração diclorometano (detecção em 254 nm). Em 6 e 7 estão representados a varredura de absorção em diferentes comprimentos de onda (acima) e o espectro de absorção em UV em 254 nm (abaixo) de cada pico. Verificar as condições cromatográficas no item 5.2.....**46**

FIGURA 12: Cromatograma em CLAE da fração 5-1, isolada da fração acetato de etila, correspondente ao pico 1 da FIGURA 9 (detecção em 254 nm). Em A está representado o espectro de absorção em UV do pico majoritário. Condições cromatográficas: fase móvel em fluxo isocrático Acetonitrila: Ácido trifluoracético 0,1% 25:75, tempo de corrida de 45 minutos**47**

FIGURA 13: Espectro de RMN gravado em soluções de CDCl₃ ou DMSO-*d*₆, operando em 300 MHz para ¹H (à esquerda) e 75.5 MHz para ¹³C (à direita). Os deslocamentos químicos foram dados em δ (ppm) usando TMS como padrão externo. Ao centro: proposta da estrutura do composto isolado (5-glico-7-metil-4-fenil-4a,8a-di-hidrocromen-2-ona)**48**

FIGURA 14: Curva-padrão de quercetina utilizada para o ensaio de quantificação de flavonóides totais no extrato bruto e frações de *Passiflora serratodigitata* L. Ao lado: equação da reta de tendência e valor de R². Cada triplicata de amostra foi lida três vezes.....**50**

FIGURA 15: Curva-padrão de Trolox® utilizada no ensaio de atividade antioxidante de extrato bruto e frações de *Passiflora serratodigitata* L. Ao lado: equação da reta de tendência e valor de R². Cada triplicata de amostra foi lida três vezes**51**

FIGURA 16: Curva-padrão de atividade antioxidante de acordo com a concentração de Trolox®. Os dados são acompanhados por linha de tendência com equação e valor de R². Cada triplicata de amostra foi lida três vezes**52**

FIGURA 17: Atividade antioxidante de acordo com a concentração de extrato bruto de *Passiflora serratodigitata* L. Os dados são acompanhados por linha de

tendência com equação e valor de R². Cada triplicata de amostra foi lida três vezes52

FIGURA 18: Atividade antioxidante de acordo com a concentração da fração acetato de etila de *Passiflora serratodigitata*. Os dados são acompanhados por linha de tendência com equação e valor de R². Cada triplicata de amostra foi lida três vezes53

FIGURA 19: Atividade antioxidante de acordo com a concentração da fração aquosa de *Passiflora serratodigitata*. Os dados são acompanhados por linha de tendência com equação e valor de R². Cada triplicata de amostra foi lida três vezes53

FIGURA 20: Deslocamento de água produzido por edema em pata de rato, para cada grupo, controle (água) e EB de *P. serratodigitata* (em duas doses) de acordo com o tempo após injeção dos testes; *: p<0,05 em relação ao grupo controle. N= 7 para cada grupo.....54

FIGURA 21: Atividade antiúlcera do extrato bruto de *Passiflora serratodigitata* L. Em A, B, C, D e E estão representados estômagos característicos respectivamente de cada grupo; *: p<0,05; **: p<0,01 em relação ao controle negativo (n=7 para cada grupo); Dose de lansoprazol: 30mg/kg.....57

FIGURA 22: Atividade antiúlcera comparativa entre extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa residual de *Passiflora serratodigitata* L. Em A, B, C, D e E estão representados estômagos característicos respectivamente de cada grupo; ***: p<0,001 em relação ao controle negativo (n=7 para cada grupo); Dose de lansoprazol: 30 mg/kg.....58

FIGURA 23: Comparação entre atividade antiúlcera da fração acetato de etila (barras claras) em comparação com a fração aquosa residual (barras escuras) de *Passiflora serratodigitata* L. Em A, B, C, D e E estão representados estômagos característicos respectivamente de cada grupo (acima: fração acetato de etila e abaixo: fração aquosa); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001 em relação ao controle negativo (n=7 para cada grupo); Dose de lansoprazol: 30 mg/kg.....59

FIGURA 24: Atividade antiúlcera comparativa entre o extrato bruto de *Passiflora serratodigitata* L. encapsulado e não encapsulado. Em A, B, C, D e E

estão representados estômagos característicos respectivamente de cada grupo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ em relação ao controle negativo (n=7 para cada grupo).....**61**

FIGURA 25: Atividade antiúlcera comparativa entre a fração acetato de etila de *Passiflora serratodigitata* L. encapsulada (dose de 5 mg/kg) e não encapsulada (dose 50 mg/kg). Em A, B, C, D e E estão representados estômagos característicos respectivamente de cada grupo; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ em relação ao controle negativo (n=7 para cada grupo).**62**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Principais compostos no óleo essencial de espécies de <i>Passiflora</i> (adaptado de DAWHAN, 2004)	9
TABELA 2: Triagem fitoquímica realizada na droga vegetal e no extrato bruto de <i>Passiflora serratodigitata</i> L.	26
TABELA 3: Sistemas cromatográficos em camada delgada utilizados na caracterização do extrato bruto e frações de <i>P. serratodigitata</i> (adaptados de WAGNER, 1996).....	28
TABELA 4: Composição do meio reacional no ensaio de determinação de atividade antioxidante de extrato bruto e frações de <i>Passiflora serratodigitata</i> L. com DPPH	31
TABELA 5: Fórmula das nanocápsulas obtidas pelo método de precipitação de polímero pré-formado contendo o extrato bruto ou a fração acetato de etila de <i>Passiflora serratodigitata</i> L. para volume final de 10 mL	36
TABELA 6: Produtos derivados de folhas e caules de <i>Passiflora serratodigitata</i> utilizados nos ensaios de atividade antiúlcera, com as respectivas doses utilizadas.....	38
TABELA 7: Resultado da triagem fitoquímica da droga vegetal (folhas e caules secos) e extrato bruto de <i>Passiflora serratodigitata</i> L.....	39
TABELA 8: Rendimento (em relação à massa de extrato bruto) das frações preparadas a partir de 80g do extrato bruto de folhas e caules de <i>Passiflora serratodigitata</i> L.	40
TABELA 9: Fator de retenção (R _f) e coloração no UV das zonas mais marcantes do cromatograma representado na FIGURA 8. A: Extrato bruto; B: Fração hexânica; C: Fração diclorometano; D: Fração acetato de etila; E: Fração aquosa; F: Padrão rutina.....	42
TABELA 10: Quantificação de flavonóides totais em produtos derivados de folhas e caules de <i>Passiflora serratodigitata</i> L., pelo método	

espectrofotométrico de complexação com cloreto de alumínio. Cada valor é a média de 6 dados, acompanhado de seu erro-padrão**49**

TABELA 11: Concentração Eficaz 50% (CE50) média do extrato bruto e frações de *Passiflora serratodigitata* no ensaio de atividade antioxidante. Cada dado é acompanhado de seu erro-padrão. . Cada triplicata de amostra foi lida três vezes**51**

TABELA 12: Média de valores de contagem (cpm) de contador gamma em 100 mcL de plasma de ratos $\pm$ erro padrão no ensaio de indução de edema de pele, segundo grupo (controle com água e extrato bruto de *Passiflora serratodigitata* na dose de 400 mg/kg) e substância pró-inflamatória. Os resultados não foram estatisticamente significantes. N= 5 para cada grupo**55**

TABELA 13: Parâmetros físico-químicos de caracterização dos sistemas nanoparticulados, de acordo com o ativo incorporado. Nanopartícula branca: não houve incorporação de ativo**55**

TABELA 14: Porcentagem de proteção gástrica (em relação ao controle negativo) de diferentes doses de produtos de *Passiflora serratodigitata* L.....**60**

LISTA DE ABREVIATURAS

ARLU: Área relativa de lesão ulcerativa

ATLU: Área total de lesão ulcerativa

CCD: Cromatografia em camada delgada

CE₅₀: Concentração efetiva 50%

CEEA: Comissão de Ética em Estudo em Animais

cm: Centímetro

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DL₅₀: Dose letal 50%

DMSO: Dimetilsulfóxido

EB: Extrato hidroetanólico bruto liofilizado

EP: Erro-padrão

g: Grama

GABA: Ácido gama-aminobutírico

HDL: *High density lipoprotein* (lipoproteína de alta densidade)

LDL: *Low density lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade)

MHz: Megahertz

mcg: Micrograma

mcL: Microlitro

min: Minuto

nm: Nanômetro

NP: Difenilboriloxietilamina a 1% em metanol

RMN: Ressonância magnética nuclear

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura.....	4
2.1 A Família Passifloraceae e o gênero <i>Passiflora</i>	4
2.2 Composição química das principais espécies	5
2.2.1 Histórico e generalidades	5
2.2.2 Flavonóides	6
2.2.3 Alcalóides	7
2.2.4 Outros fitoconstituintes	9
2.3 Principais atividades farmacológicas estudadas	9
2.3.1 Atividade ansiolítica	11
2.3.2 Outras atividades sobre o sistema nervoso central.....	14
2.3.3 Atividade anti-inflamatória e cicatrizante.....	15
2.3.4 Atividade antioxidante.....	17
2.3.5 Atividades antibiótica e antitumoral.....	17
2.3.6 Outras atividades.....	19
2.3.7 Avaliação toxicológica	21
3. Objetivos.....	24
4. Material e Métodos.....	25
4.1 Preparo do extrato bruto	25
4.2 Triagem fitoquímica	25
4.3 Perfil cromatográfica	27
4.3.1 Cromatografia em camada delgada.....	27
4.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	29
4.4 Isolamento e elucidação estrutural de compostos.....	29
4.5 Quantificação de flavonóides	30
4.6 Determinação de atividade antioxidante <i>in vitro</i>	30
4.7 Determinação de atividade anti-inflamatória	32

4.7.1	Indução de edema de pata traseira	33
4.7.2	Aumento de permeabilidade vascular/ Extravasamento plasmático..	33
4.8	Preparo e caracterização de nanopartículas	34
4.8.1	Preparo de nanopartículas.....	35
4.8.2	Caracterização física e físico-química das suspensão de nanopartículas.....	36
4.8.3	Eficiência de encapsulamento	37
4.9	Atividade antiúlcera.....	37
4.10	Análise estatística	38
5.	Resultados.....	39
5.1	Triagem fitoquímica e perfil cromatográfico em CCD	39
5.2	Perfil cromatográfico em CLAE, isolamento e elucidação estrutural de compostos	42
5.3	Quantificação de flavonóides	49
5.4	Determinação de atividade antioxidante <i>in vitro</i>	51
5.5	Determinação de atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	54
5.6	Preparo e caracterização de nanopartículas	55
5.7	Atividade antiúlcera.....	56
5.8	Comparação de atividade antiúlcera entre formulações nanoencapsuladas e extratos não nanoencapsulados	60
6.	Discussão	63
7.	Conclusões.....	71
8.	Referências Bibliográficas	73

INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de enorme biodiversidade, dada a sua localização próxima do Equador e seu extenso território, que abrange diferentes biomas, como a Amazônia, o Cerrado e o Pantanal (RATTER *et al.*, 1997). A Mata Atlântica possui a maior biodiversidade do Brasil, sendo que ela está passível de desaparecer, pois a sua área atual representa menos de 10% da área original (MORELLATO & HADDAD, 2000; KRESS *et al.*, 1998).

O uso de plantas medicinais retiradas da comunidade é um dos métodos mais antigos utilizados no tratamento de afecções do ser humano (ARAUJO *et al.*, 2008). Os estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos permitem identificar as plantas medicinais que mais são usadas pela população, culminando em um compendio popular de plantas utilizadas para promover a saúde. Muitas vezes a atividade farmacológica ainda não foi comprovada cientificamente, sendo que esses estudos permitem selecionar espécies candidatas a estudos farmacognósticos (ARAUJO *et al.*, 2008). Assim, o conhecimento popular associado com o descobrimento tecnológico permite uma fixação das tradições brasileiras, contribuindo para o fortalecimento da nossa identidade.

O estudo de espécies vegetais usadas tradicionalmente pela população possibilitou a identificação de compostos farmacologicamente ativos (McGUIRE, 2001; PINK *et al.*, 2005). Muitos desses compostos foram isolados e deram origem a fármacos intensamente utilizados na terapêutica, como, por exemplo, a digoxina (isolada de folhas de *Digitalis lanata* Ehrhart.), a morfina (proveniente de *Papaver somniferum* L.) e o taxol (*Taxus brevifolia* Nutt.), dentre outros (MAHMMOUD, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2007; McGUIRE, 2001; PINK *et al.*, 2005). Estima-se que trinta por cento das substâncias identificadas como promissoras para o tratamento de doenças, entre 1981 e 2002, sejam produtos naturais ou derivados destes. Além destes, cerca de um quinto das novas moléculas são produtos sintetizados que mimetizam as estruturas encontradas na natureza (NEWMAN *et al.*, 2003; BALUNAS & KINGHORN, 2005). No entanto, tem-se verificado ao longo do tempo que muitas vezes a miscelânea de compostos dentro de um extrato possui uma atividade farmacológica, e não somente o composto bioativo isolado. Um grande desafio do profissional que trabalha com plantas medicinais é a variedade de informação disponível, e a grande variabilidade dos estudos. Inúmeros fatores

podem afetar a produção de um extrato vegetal, e consequentemente os resultados de um ensaio farmacológico (BALUNAS & KINGHORN, 2005).

Úlceras pépticas são lesões crônicas, geralmente aparecem isoladas e com menos de 4 cm de diâmetro, e embora possam ocorrer em qualquer porção do trato gastrointestinal, a grande maioria se localiza no duodeno e estômago (KUMAR *et al.*, 2005). De acordo com SUNG e colaboradores (2009), a incidência anual de úlcera péptica no mundo varia de 0,10 a 0,19%, e a prevalência, de 0,12 a 1,5%. Calcula-se que cerca de quatro milhões de pessoas possuem úlceras pépticas, tanto duodenais quanto gástricas, sendo que a cada ano são diagnosticados mais de 350.000 novos casos. Aproximadamente 180.000 pacientes são hospitalizados a cada ano, e 5.000 morrem todos os anos devido a complicações das úlceras pépticas (SAUL *et al.*, 2007). A probabilidade de se desenvolver uma úlcera péptica é diferente de acordo com o sexo: cerca de 10% para homens e 4% para mulheres. Isso é devido provavelmente a uma maior preocupação das mulheres tanto com a alimentação quanto pela realização de check-ups periódicos (SAUL *et al.*, 2007).

Nanopartículas são sistemas micelares que apresentam diâmetro inferior a 1 μm (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Dentre os inúmeros tipos de partícula, as nanocápsulas poliméricas são constituídas basicamente por uma fase oleosa envolvida dentro de um polímero, sendo o sistema disperso em uma fase aquosa (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Recentemente, diversos tipos de nanopartículas têm sido utilizados como carreadores de fármacos, tais como antitumorais (HUREAUX *et al.*, 2010), hormônios endógenos (DAMGÉ *et al.*, 2010) e outros ativos (LI *et al.*, 2009; NASSAR *et al.*, 2009). As principais vantagens desse sistema no âmbito farmacêutico são a possibilidade de mudança de via de administração (intravenosa para oral, por exemplo), redução de dose e aumento de estabilidade do princípio ativo (MORAS-HUERTAS *et al.*, 2010).

A necessidade de estudar espécies vegetais com potencial terapêutico e em vias de extinção levou em 2005, a um projeto interunidades derivado do projeto temático intitulado **“Passifloras Nativas e Cultivadas do Brasil. Avaliação Farmacognóstica, Fitoquímica e Farmacológica Orientada para a Valorização do Uso Popular e o Desenvolvimento de Medicamentos**

Autóctones”. Tal projeto tinha como objetivo obter a caracterização farmacognóstica das espécies nativas e cultivadas de *Passiflora*, estabelecendo parâmetros para o controle de qualidade das drogas vegetais e dos extratos das plantas híbridas, das variedades e dos cultivares desenvolvidos no país. Dentro do contexto desse projeto temático, investigou-se principalmente a atividade sobre sistema nervoso central (a cargo da Universidade Federal de São Paulo) e trato gastrointestinal (Universidade de São Paulo).

É nesse contexto que surge a necessidade de avaliar a atividade farmacológica de espécies vegetais nativas no Brasil, ainda sem nenhum estudo farmacológico realizado, e focar o estudo no isolamento biodirecionado de princípios ativos naturais. O trabalho a seguir descreve a avaliação fitoquímica e farmacológica da espécie *Passiflora serratodigitata* L. (Passifloraceae) (Figura 1) com enfoque em úlcera gástrica, além de estudar a incorporação de seu extrato e frações em um sistema nanoparticulado.

FIGURA 1: Ramos floridos de *Passiflora serratodigitata* L. (Créditos: IAC – Soares-Scott, M.D.)

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A FAMÍLIA PASSIFLORACEAE E O GÊNERO *Passiflora*

A família Passifloraceae destaca-se entre os principais grupos vegetais nativos utilizados na medicina popular brasileira (CARLINI, 2003). Ela é representada por aproximadamente 23 gêneros e 600 espécies distribuídas majoritariamente em regiões tropicais e subtropicais (DERMARDEROSIAN & BEUTLER, 2002), sendo que 120 dessas espécies ocorrem no Brasil e 38 apenas no Estado de São Paulo (BERNACCI, 2003). O gênero *Passiflora* compreende cerca de 400 espécies, sendo o gênero mais importante dessa família. Suas espécies apresentam hábito escandente, folhas alternas, estípulas, gavinhas, nectários extraflorais e corola composta de uma ou várias séries de filamentos ou lobos no ápice do hipanto (JUDD *et al.*, 1999; PLOTZE *et al.*, 2005).

O gênero *Passiflora* foi descrito pela primeira vez por Nicolau Monardis em 1569 (SOUZA, 1997). O nome popular pelo qual essas espécies são conhecidas (maracujá) é de origem tupi-guarani, e significa “comida feita em cuia”, numa alusão ao formato dos frutos do vegetal. “Maracujá” é empregado para designar diversas espécies de *Passiflora* cultivadas por seu valor ornamental, por suas propriedades medicinais ou, mais destacadamente, pelos frutos apreciados na alimentação (FREITAS, 2006). Baseado em informações de campo e de literatura, das 519 espécies do gênero *Passiflora*, COPPENS D'EECKENBRUGGE (2003) relatou 81 que produzem frutos comestíveis. Entretanto, deste total, somente algumas espécies alcançaram o cultivo com fins comerciais. Entre estas espécies destacam-se a *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg., conhecida como maracujazeiro amarelo e a *Passiflora alata* Curtis, ou maracujazeiro doce. Esta última tem sido a segunda espécie cultivada de maior importância para o Brasil, particularmente no Estado de São Paulo, onde, entre os anos de 2000 e 2004 representou de 3,6 a 5,7%, com média de 4,5% do total de maracujá comercializado na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (FREITAS, 2006). *Passiflora edulis* é a espécie mais utilizada como agente flavorizante e como suco na indústria alimentícia (OLIVEIRA, 2002).

Algumas das espécies possuem monografias específicas em diversas farmacopéias. A Farmacopéia Brasileira, em sua 1ª edição, oficializou as folhas

de *Passiflora alata* Dryander, embora outras espécies deste gênero encontrem emprego na fitoterapia, entre elas, *Passiflora edulis* Sims. (BRUNETON, 1999). A espécie européia, *P. incarnata* L., é a que possui mais monografias inscritas em compêndios oficiais. Os produtos dela derivados são reconhecidos internacionalmente como medicamentos fitoterápicos (MORAES, 1995; SOUZA & ORTEGA, 1997; DERMARDEROSIAN & BEUTLER, 2002; PLOTZE *et al.*, 2005; CARLINI, 2003).

2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES

2.2.1 HISTÓRICO E GENERALIDADES

Do ponto de vista químico, o gênero *Passiflora* caracteriza-se principalmente pela presença de flavonóides, alcalóides e glicosídeos cianogênicos. A composição química de interesse farmacêutico presente no gênero *Passiflora* varia muito entre as espécies, embora basicamente estudaram-se flavonóides e alcalóides (BOKSTALLER & SCHMIDT, 1997; ABOURASHED *et al.*, 2003). Os flavonóides têm merecido destaque na utilização como substâncias marcadoras na análise de medicamentos fitoterápicos. Os flavonóides estão presentes em muitas partes das plantas (principalmente em folhas e frutos), e são do tipo flavonas glicosiladas e antocianinas. Já os alcalóides encontram-se principalmente em folhas e caules, e são do tipo harmânico. Além desses compostos, foram isolados glicosídeos cianogênicos, compostos voláteis, saponinas, carotenóides, além de compostos de interesse nutricional (aminoácidos, vitaminas, minerais, fibras), encontrados principalmente no fruto e na semente (ZIBADI *et al.*, 2007).

Até meados da década de 60, os estudos sobre *Passiflora* davam ênfase à investigação da presença de alcalóides indólicos do tipo harmânico (BARROSO, 1978; SACCO, 1980). A farmacologia dos alcalóides harmânicos foi alvo de interesse desde o início do século e vários efeitos farmacológicos como alucinações, tremores e convulsões crônicas, inibição da monoamino oxidase, propriedades estimulantes, anti-helmíntica, antitripanosômica e antileishmania foram descritos (SACCO, 1980).

Com o passar dos anos houve uma mudança de enfoque rumo ao estudo de compostos de natureza flavonoídica sem, entretanto, ocorrer fato que justificasse este redirecionamento. LUTOMSKI, em 1959, foi o primeiro autor que atribuiu a estas substâncias, pelo menos parte da atividade sedativa de *Passiflora* e enfatizou a importância da presença conjunta das frações alcaloídica e flavonoídica na eficiência do resultado terapêutico. O flavonóide vitexina, testado isoladamente por PRABHAKAR em 1981, apresentou efeitos hipotensor, anti-inflamatório e antiespasmódico. Os flavonóides 2''-O-xilosilvitexina e 2-vicenina, encontrados respectivamente, em *P. alata* e em *P. incarnata*, mostraram alta atividade hipotensiva quando isolados de espécies pertencentes ao gênero *Citrus*. A presença destes compostos poderia, até certo ponto, justificar a atividade hipotensora encontrada em algumas pesquisas (PEREIRA, 2000).

O desenvolvimento de técnicas de fracionamento e instrumentais tem possibilitado o melhor conhecimento da composição das espécies. Os primeiros estudos com relação aos flavonóides em *Passiflora* datam da década de 60, quando foi estudada principalmente a espécie *P. incarnata*, que é até hoje a mais estudada. As folhas de *P. alata* contêm C-glicosilflavonóides, rutina, o alcalóide harmano e glicosídeos esteroidais e triterpênicos. Segundo BRUNETON (1999), a folha de *P. incarnata* contém ácidos fenólicos, fitoesteróis, óleo essencial, glicosídeos cianogênicos (ginocardina), maltol e traços de alcalóides indólicos (harmano, harmina e harmol).

2.2.2 FLAVONÓIDES

Os flavonóides de *P. incarnata* são derivados da apigenina e luteolina, e de acordo com estudos iniciados na década de 80, observou-se que a constituição flavonoídica é bem mais complexa do que havia sido determinada nas décadas de 60 e 70 (BRUNETON, 1999). O teor de flavonóides na droga vegetal originada das folhas de *P. incarnata* é cerca de 2,5%, sendo que os compostos que estão em maior concentração são flavonas di-C-glicosídeos (shaftosídeo e isoshaftosídeo), 2''-O-glicosídeos provenientes de isovitexina, iso-orientina, swertisina e lucenina-2 (DHAWAN, 2004).

Atualmente sabe-se que além da apigenina e da luteolina, há a presença de quercetina, kaempferol, 6- β -D-glicopiranosil-8- β -xilopiranosilapigenina; flavonóides C-glicosídeos vitexina, isovitexina, orientina, iso-orientina, schaftosídeo, isochaftosídeo, isovitexina-2''-O- β -glicopiranosídeo, iso-orientina-2''-O-glicopiranosídeo, 2-glicosilapigenina, isoscoparina-2''-O-glicosídeo, 2''-O-glicosil-6-C-glicosilapigenina, 6- β -D-glicopiranosil-8- β -D-ribopiranosilapigenina e swertisina (DHAWAN, 2004). Alguns exemplos de flavonóides encontrados no gênero *Passiflora* estão ilustrados na FIGURA 2.

Orientina $R_1 = H$ $R_2 = \text{glicose}$ $R_3 = OH$

Iso-orientina $R_1 = \text{glicose}$ $R_2 = H$ $R_3 = OH$

Vitexina $R_1 = H$ $R_2 = \text{glicose}$ $R_3 = H$

Isovitexina $R_1 = \text{glicose}$ $R_2 = H$ $R_3 = H$

FIGURA 2: Flavonóides encontrados em espécies de *Passiflora* L.

2.2.3 ALCALÓIDES

Os alcalóides presentes em *Passiflora* são do tipo indólico. Os alcalóides indólicos compreendem um grande grupo de alcalóides atualmente conhecidos. Muitos têm valor na medicina como tranqüilizantes e no tratamento da hipertensão. Dentre as espécies de maracujá, *P. incarnata* é a espécie mais estudada com relação aos alcalóides. Pode ser observado que somente em

estudos da década de 60 sobre *P. incarnata*, graças à cromatografia em camada delgada, foram detectados harmana, harmol, harmina, harmalol e harmalina. Em estudos recentes, entretanto, somente traços de harmana ou mesmo nenhum alcalóide foi relatado, embora o trabalho de REHWALD (1995) confirme a presença desses alcalóides em *P. incarnata* através de um método seletivo e validado para análise no que tange aos traços. Esse método consiste na extração dos alcalóides do material vegetal, purificação e concentração da fração alcaloídica por extração em fase sólida em Extrelut e outros cartuchos de troca catiônica e subsequente análise por cromatografia líquida de alta eficiência usando detectores de arranjo de diodos e de fluorescência. Com este método foi possível separar os cinco alcalóides: harmana, harmina, harmol, harmalina e harmalol, com alta resolução (REHWALD, 1995).

Harmana R = H

Harmol R = OH

Harmina R = OCH₃

Harmalol R = OH

Harmalina R = OCH₃

FIGURA 3: Alcalóides β -carbolínicos encontrados em *Passiflora* L.

Uma explicação para estas contradições e discrepâncias dos dados encontrados na literatura deve-se, em parte, às metodologias aplicadas na quantificação das substâncias. Além disso, podem-se considerar como fatores de variação do teor alcaloídico, em drogas vegetais, os órgãos empregados, a época e o local de colheita. Considerando-se que a droga, comercialmente utilizada, é representada pelas partes aéreas de *Passiflora*, a variação na quantidade de folhas em relação ao caule também pode levar a uma queda significativa do teor alcaloídico (PEREIRA, 2000). Alguns exemplos de alcalóides encontrados no gênero *Passiflora* estão ilustrados na FIGURA 3.

2.2.4 OUTROS FITOCONSTITUINTES

Vários outros constituintes que têm sido relatados de espécies de *Passiflora*, principalmente de *P. incarnata*, e incluem maltol, derivado de γ -benzopirona, carboidratos tais como rafinose, sacarose, D-glicose e D-frutose; óleo essencial contendo hexanol, álcool benzílico, linalol, 2-feniletilálcool, éster do ácido metil-2-hidroxibenzóico, carvona, trans-anetol, eugenol, isoeugenol, β -ionona, α -bergamotol, fitol e um glicosídeo cianogênico derivado da ginocardina. Além disso, existem vários constituintes que são responsáveis pelo odor típico de *Passiflora*, tais como limoneno, cumeno, α -pineno, prezizaeno, zizaeno e zizaneno; (DHAWAN, 2004).

TABELA 1: Principais compostos no óleo essencial de espécies de *Passiflora* (adaptado de DAWHAN, 2004).

Composto	Referência
Hexanol, álcool benzílico, linalool, álcool 2-feniletílico, ácido 2-hidroxibenzóico, carvona, trans-anetol, eugenol, isoeugenol, beta-inona, fitol, alfa-bergamotol	Buchbauer e Jirovetz, 1992
Cumeno, alfa-pineno, pezizaeno, zizaeno, zizaneno	Buchbauer <i>et al.</i> , 1992
Hexil caproato, hexil butirato, etil caproato e etil butirato	Dawes e Paul, 1961
Limoneno	Kuhlmann, 1984
2-tridecanona, ácido octadecenóico, 2-pentadecanona, ácido hexadecanóico, 2-tridecanol, ácido octadecanóico e óxido cariofileno	Arriaza <i>et al.</i> , 1997

2.3. PRINCIPAIS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS ESTUDADAS

O uso de extratos de *Passiflora* decorreu de suas propriedades sedativas, tendo início na Europa, no século XVII. A ação sedativa de *P.*

incarnata foi registrada pela primeira vez por Phares, em 1867 (FREITAS, 1985). Os extratos de *Passiflora* têm sido utilizados na medicina popular americana e européia, devido às suas reputadas propriedades sedativa e ansiolítica (DERMARDEROSIAN & BEUTLER, 2002). Embora estas atividades tenham recebido atenção por parte dos pesquisadores no mundo, as substâncias ativas das espécies ainda não foram claramente determinadas (PETRY *et al.*, 2001; DHAWAN, 2004). Entre os compostos sugeridos como responsáveis pela atividade sedativa das passifloras estão os flavonóides (ULUBELEN *et al.*, 1982), alcalóides (LUTOMSKI & MALEK, 1975) e o maltol (AOYAGI *et al.*, 1974).

A partir da década de trinta, diversos autores (FELLOWS & SMITH, 1938; RUGGY & SMITH, 1940) procuraram avaliar e por vezes, relacionar as atividades farmacológicas de extratos de *Passiflora* com as prováveis substâncias ativas. Durante algumas décadas os alcalóides foram investigados (LUTOMSKI, 1959). Posteriormente, os flavonóides tornaram-se o foco das atenções. No entanto, nenhuma investigação chegou ao nível de mecanismo de ação das substâncias. A partir da década de noventa, os autores procuraram relacionar as atividades farmacológicas observadas com extratos de *Passiflora* aos flavonóides, que em pouco tempo tornaram-se o novo foco das atenções (WOLFMAN *et al.*, 1994; SOULIMANI *et al.*, 1997).

Além da atividade ansiolítico-hipnótica, que é sem dúvida a mais estudada, o uso de *Passiflora* para outros distúrbios já foi descrito em relatos na literatura: sobre suas propriedades antiespasmódicas, distúrbios gastrintestinais (DUKE, 2002; MAHADY *et al.*, 2005), insônia, histeria (KRUGER, 1992; GARCIA, 2000), atividade hipnótica suave (SCAVONE & PANIZZA, 1978), hipotensora (GRIEVE & LEYEL, 1994) e miorrelaxante (GARCIA, 2000). Existem ainda relatos sobre o uso de *Passiflora* em casos de asma, diarreia, convulsão infantil (BALBACHAS, 1957), no tratamento de Parkinson (DUKE, 1997). Há ainda relatos da utilização das folhas do maracujá no combate a febres intermitentes, inflamações cutâneas, erisipela e como anti-helmínticas (CORRÊA, 1984).

2.3.1. ATIVIDADE ANSIOLÍTICA

Os estudos sobre a atividade de extratos de *Passiflora* começaram na década de 40, quando RUGGY e SMITH (1940) isolaram uma substância, que chamaram de “o princípio fisiologicamente ativo” de *P. incarnata*. Os autores observaram que tanto o princípio ativo como o extrato fluido apresentavam ação sedativa.

Em 1949, Neugebauer relacionou a atividade sedativa de extratos de *P. incarnata*, *P. edulis* e *P. bryonioides* à presença de uma substância de caráter básico, provavelmente um alcalóide. Ele acreditava que uma das substâncias estudadas, obtida a partir de *P. incarnata* e com atividade sedativa em ratos, era idêntica à maracujina, isolada por Peckolt (1909) de extratos obtidos de espécies brasileiras de *Passiflora*, entre elas *P. alata*. Além disso, o autor sugeriu que a substância fosse da mesma família do composto obtido por Ruggy e Smith em 1940 (HEGNAUER, 1990).

AOYAGI e colaboradores, durante a avaliação das atividades farmacológicas do extrato seco de *P. incarnata*, isolaram maltol (3-hidroxi-2-metil-4-pirona) da fração solúvel em ácido clorídrico, por sublimação sob pressão reduzida, com rendimento de 0,05% (AOYAGI *et al.*, 1974). Os autores avaliaram as atividades farmacológicas do extrato seco, da sua fração solúvel em ácido clorídrico, do maltol e do etilmaltol (derivado sintético do maltol). A fração solúvel em ácido clorídrico diminuiu o consumo de oxigênio do córtex de ratos em altas concentrações. O maltol causou depressão do sistema nervoso central nos ratos, expressa em potenciação de sono induzido por hexobarbital, atividade anticonvulsivante e inibição da atividade motora. O etilmaltol mostrou efeitos similares ao maltol, porém, a atividade anticonvulsivante foi mais potente e a inibição da atividade motora espontânea foi menor.

O mecanismo de ação sedativa dos alcalóides β -carbolínicos foi estudado por ROMMELSPRACHER e colaboradores em 1980. Os autores avaliaram a interação de diversos alcalóides deste grupo na ligação específica de [3 H]-flunitrazepam com receptores benzodiazepínicos. O estudo foi realizado em membrana cerebral de rato e retina de bovinos, ambos contendo altas concentrações dos receptores benzodiazepínicos. Dentre os compostos investigados, a harmana e a nor-harmana foram os inibidores mais potentes da

ligação específica do [^3H]-flunitrazepam, com valores de IC_{50} em concentrações micromolares. Os outros derivados, tais como, harmina, harmalina e diversos tetraidro-derivados foram, no mínimo, dez vezes menos potentes (ROMMELSPACHER *et al.*, 1980). O alcalóide harmana, encontrado no cérebro de ratos e na urina humana, segundo os autores, era o mais potente inibidor conhecido da ligação específica do [^3H]-flunitrazepam. Sua afinidade com os receptores benzodiazepínicos mostrou-se centenas de vezes maior que a da inosina e da hipoxantina (que por sua vez possuem valores de IC_{50} na mesma concentração do L-triptofano e da triptamina). Desse modo, os autores sugerem que harmana, ou outros alcalóides β -carbolínicos, poderiam ser candidatos em potencial como ligantes endógenos do receptor benzodiazepínico (ROMMELSPACHER *et al.*, 1980).

OGA e colaboradores (1984) verificaram que o extrato de suas folhas potencializou o sono induzido pelo pentobarbital em ratos, aumentou o tempo de latência na convulsão provocada por esticnina e diminuiu a atividade motora espontânea.

O extrato fluido de órgãos aéreos de *P. incarnata*, administrado por via oral e intraperitoneal em ratos, aumentou o limiar nociceptivo no teste de *tail-flick* e de placas quentes (SPERONI & MINGHETTI, 1988). Quando administrado por via intraperitoneal, o extrato prolongou significativamente o tempo de sono, protegeu os animais do efeito convulsivo do pentilenotetrazol e afetou a locomoção. O extrato foi particionado por solventes e analisado a partir de métodos cromatográficos, acusando a presença de, pelo menos, dois produtos ativos, um lipofílico e outro, hidrofílico; no entanto, estes compostos não correspondiam a flavonóides ou alcalóides presentes no extrato. Além disso, o composto lipofílico não pareceu corresponder a uma estrutura aromática ou heterocíclica. Segundo os mesmos autores (SPERONI & MINGHETTI, 1988), o aparente efeito antinociceptivo foi atribuído à deficiência motora induzida pelo extrato, uma vez que o extrato afetou a atividade locomotora e o tempo de sono induzido por pentetrazol de forma significativa.

O flavonóide crisina, isolado de *P. caerulea*, foi descrito como um agonista parcial dos receptores benzodiazepínicos, por demonstrar ação ansiolítica sem indução de sedação ou de relaxamento muscular (WOLFMAN *et al.*, 1994). Em 1997, SOULIMANI e colaboradores verificaram efeitos

comportamentais em camundongos, utilizando extratos hidroalcoólicos liofilizados e aquosos de órgãos aéreos de *P. incarnata*. Segundo os autores, o extrato hidroalcoólico apresentou atividade ansiolítica com 400 mg/kg, enquanto que o extrato aquoso apresentou atividade sedativa na mesma dosagem.

Em 1991, MALUF e colaboradores observaram efeito depressor não específico quando investigaram os efeitos hipnótico e sedativo do extrato aquoso obtido de folhas de *P. edulis* quando administrados em camundongos, ratos e humanos. Em contrapartida, os autores não observaram efeito hipnótico-sedativo. Este estudo é um dos poucos que coloca em dúvida a atividade sedativo-hipnótica da espécie.

ZANOLI e colaboradores, em 2000, avaliaram os efeitos comportamentais da administração de apigenina e crisina em ratos. Os autores observaram que os dois flavonóides foram igualmente capazes de reduzir a atividade locomotora, quando administrados por via oral em uma dose de 25 mg/kg. No entanto, a crisina apresentou atividade ansiolítica significativa com uma dose de 1 mg/kg, enquanto que a apigenina não exibiu atividade com a mesma dose. Além disso, o efeito sedativo destes flavonóides não pôde ser atribuído a uma interação com os receptores GABA-benzodiazepínicos, uma vez que o efeito não foi bloqueado pelo antagonista benzodiazepínico flumazenil.

PETRY e colaboradores (2001) verificaram atividade ansiolítica do extrato hidroetanólico das folhas de *Passiflora edulis*, em animais de laboratório. O extrato aquoso de flores promoveu diminuição da atividade locomotora e prolongou o tempo de sono em roedores e humanos (WHEATLEY, 2005). Santos e colaboradores investigaram em 2005 a ação sedativa de extratos e frações de *P. actinia*. Apesar de obter resultados satisfatórios, o efeito sedativo não pôde ser relacionado a nenhum grupo específico de substâncias (SANTOS *et al.*, 2005).

Alguns estudos clínicos foram realizados empregando extratos padronizados de *Passiflora*. Em um estudo duplo-cego randomizado, trinta e dois pacientes com ansiedade, receberam aleatoriamente 45 gotas de uma tintura de *P. incarnata* (+ comprimido placebo) ou 30 mg de oxazepam (+ gotas placebo) por dia. Após quatro, sete, vinte e um e trinta dias de tratamento, não

houve diferença significativa em termos de nível de ansiedade entre controle positivo e tratados. Pacientes tratados com a tintura relataram menos efeitos colaterais que aqueles que receberam o ansiolítico sintético. Concluiu-se que o extrato de *P. incarnata* possui a mesma eficácia que o ansiolítico sintético, possuindo ainda efeitos adversos menos expressivos (AKHONDZADEH, 2001).

Um estudo multicêntrico, duplo-cego randomizado avaliou a associação de *Passiflora incarnata* com *Hypericum perforatum* no tratamento da depressão moderada em associação com ansiedade. Nos pacientes que receberam a medicação houve uma redução muito significativa ($p < 0,0001$) nos escores *Hamilton Rating Scale for Depression*, ou HAM-D (para avaliar o grau de depressão), sendo que no grupo-placebo não houve essa melhoria. Os autores concluem que o uso dessa medicação é apropriado para pacientes com depressão moderada associada à ansiedade, havendo uma boa eficácia terapêutica, com poucos efeitos adversos (CHAUDHRY, 2007). Em um estudo duplo-cego controlado com placebo, realizado com 60 pacientes que seriam submetidos à cirurgia, a administração oral pré-operatória de 500 mg de extrato de *P. incarnata* reduziu a ansiedade do grupo teste de modo significativo ($p < 0,001$), sem alterações nas variáveis psicológicas e função psicomotora no pós-operatório (MOVAFEGH, 2008).

2.3.2 OUTRAS ATIVIDADES SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Nos últimos anos, alguns estudos vêm sendo realizados com a atividade sobre o sistema nervoso central de extratos de *Passiflora*, não relacionada com a atividade ansiolítica. DHAWAN e colaboradores, em 2003, avaliaram o comportamento sexual de camundongos após administração de extrato metanólico de *P. incarnata*, nas doses de 75 a 150 mg/kg. Os pesquisadores observaram um aumento significativo no número de copulas quando comparados com o grupo controle, ao qual foi administrado apenas o veículo. Além disso, os pesquisadores concluíram que o maior aumento foi na dose de 100 mg/kg, visto que em doses maiores há um predomínio do efeito sedativo, e não puderam especificar os fitoconstituintes responsáveis por essa atividade, apenas descartaram os alcalóides, por não estarem presentes no extrato

(DHAWAN *et al.*, 2003). Um estudo avaliou a atividade analgésica de extrato hidroetanólico de *P. foetida* em ratos. Quando administrado por via oral nas doses de 200 e 300 mg/kg, o extrato hidroetanólico apresentou aumento significativo da tolerância dos animais frente à fonte de algesia (chapa aquecedora). A atividade foi comparável à do controle positivo, ácido acetilsalicílico na dose de 25 mg/kg (BASHA *et al.*, 2008).

Correlacionado com o mecanismo de ação ansiolítico, um estudo avaliou o potencial anticonvulsivante do extrato hidroetanólico de *P. incarnata*. Os pesquisadores compararam a atividade do extrato, nas doses de 0,05 a 0,4 mg/kg intraperitoneal, com diazepam nas doses de 0,5 a 1 mg/kg intraperitoneal, no modelo animal de convulsão induzida por pentilenotetrazol. Eles observaram uma razoável atividade anticonvulsivante do extrato na dose de 0,4 mg/kg. Ademais, utilizando flumazenil (antagonista de receptor benzodiazepínico) e naloxona (antagonista de receptor opióide), os autores concluíram que o mecanismo de ação da atividade anticonvulsivante do extrato de *P. incarnata* pode ser devido tanto a receptores GABA quanto a receptores opióides, e correlacionaram essa atividade com a presença de flavonóides (NASSIRI-ALS *et al.*, 2007).

2.3.3 ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E CICATRIZANTE

Os estudos realizados por BORRELLI e colaboradores, em 1996, avaliaram o extrato etanólico de órgãos aéreos de *P. incarnata* quanto à atividade anti-inflamatória em ratos, quando administrado por via oral. Foi observada atividade significativa com dose de 125 a 500 mg/kg. No entanto, os pesquisadores não puderam confirmar o envolvimento de mediadores endógenos na atividade antiinflamatória nem a natureza química dos compostos do extrato, responsáveis pela atividade observada. Além do mais, o efeito anti-inflamatório observado em *P. incarnata* foi relativamente baixo quando comparado ao efeito exibido pelo ácido acetilsalicílico, fármaco de referência utilizado nos mesmos ensaios.

Recentemente, a atividade anti-inflamatória de extratos de *P. edulis* e *P. alata* passou a ser alvo de alguns estudos (BENINCA *et al.*, 2007; MONTANHER *et al.*, 2007; VARGAS *et al.*, 2007; ZUCOLOTTI *et al.*, 2009).

Um estudo sobre a atividade do extrato aquoso de *Passiflora edulis* mostrou resultados significativos no que diz respeito à inibição de infiltração de leucócitos para o foco inflamatório por inativação dos mesmos (modelo de pleurisia em rato), à inibição de produção de mieloperoxidase, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-1, sendo que nesse caso houve uma inibição maior que no controle positivo, dexametasona (MONTANHER, 2007; VARGAS *et al.*, 2007). Além disso, outro estudo comprovou atividade anti-inflamatória do extrato aquoso e de suas frações butanólica e aquosa residual. Tal atividade se expressa na inibição de migração celular e de citocinas pró-inflamatórias, provavelmente devida, segundo os autores, à presença de flavonóides C-glicosídeos (BENINCA *et al.*, 2007). Os pesquisadores conseguiram isolar iso-orientina, vicenina-2 e spinosina da fração butanólica do extrato de *P. edulis*, e verificaram que parte da atividade anti-inflamatória dos extratos poderia ser devida a estes compostos (ZUCOLOTTO *et al.*, 2009).

Em uma análise etnofarmacológica, ARAÚJO e colaboradores verificaram, dentre as espécies estudadas, que a *P. foetida* possuía indicação de atividade cicatrizante e anti-inflamatória. No entanto, os autores puderam correlacionar à presença abundante de taninos, e não de flavonóides, nas espécies reconhecidas por possuírem tais atividades (ARAÚJO *et al.*, 2008). Dois estudos avaliaram parâmetros histológicos e tensiométricos relacionados com a atividade cicatrizante de *P. edulis* em ratos. Um dos estudos avaliou cicatrização pós-cirúrgica de bexiga (GONÇALVES FILHO *et al.*, 2006), enquanto o outro avaliou cicatrização de pele (GOMES *et al.*, 2006). Segundo os autores, a administração intraperitoneal de 200 mg/kg (pele) e 250 mg/kg (bexiga) de extrato de *P. edulis* durante a cirurgia produziu efeitos favoráveis na cicatrização dos animais relacionados principalmente com diminuição de inflamação aguda e inflamação crônica, e favorecimento de proliferação fibroblástica, formação de colágeno e neoformação capilar. Ademais, os parâmetros tensiométricos comprovaram uma cicatrização mais eficiente (GONÇALVES FILHO *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2006).

2.3.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Estudos sobre a atividade de extratos de *Passiflora* têm demonstrado uma forte atividade antioxidante. Em 2007, DAVID e colaboradores avaliaram o potencial antioxidante de diversas plantas da Caatinga brasileira. Dentre as espécies escolhidas que possuem uso popular para diversas doenças, uma espécie de *Passiflora*, *P. cincinnata*, foi incluída na pesquisa. A espécie apresentou uma excelente atividade antioxidante na proteção de oxidação de β -caroteno, além de apresentar uma DE_{50} por volta de 20 mg/mL em ratos *Wistar*. Apesar desses resultados, os autores concluem que as espécies estudadas não apresentam atividade antioxidante comparável com agentes antioxidantes comercializados (DAVID *et al.*, 2007).

Pesquisadores brasileiros avaliaram a atividade antioxidante *in vitro* e *ex vivo* de extratos hidroalcoólicos de *P. alata* e *P. edulis*. Eles verificaram uma boa atividade antioxidante de ambos os extratos, embora a atividade do extrato de *P. alata* foi mais pronunciada. Os autores puderam correlacionar a atividade antioxidante com o conteúdo de polifenóis (RUDNICKI, 2007). Dois estudos mais recentes avaliaram o potencial antioxidante de diversos extratos de *P. edulis*, a partir do modelo *in vitro* de DPPH (RIPA *et al.*, 2009; SUNITHA & DEVAKI, 2009). Ambos os autores verificaram uma atividade antioxidante significativa (frações clorofórmica e éter de petróleo apresentaram IC_{50} por volta de 50 mcg/mL, em um dos casos comparável à do ácido ascórbico, embora não tenham conseguido correlacionar a atividade antioxidante com os fitofármacos presentes na espécie.

2.3.5. ATIVIDADES ANTIBIÓTICA E ANTITUMORAL

Nos últimos anos, alguns estudos avaliaram o potencial antimicrobiano de espécies de *Passiflora*. Em 2009 fez foi realizada uma triagem *in vitro* de atividade antimicrobiana de diferentes extratos de *P. edulis*. Os autores observaram que os extratos éter de petróleo e clorofórmio produzidos a partir do caule da planta apresentam uma atividade antimicrobiana significativa (8-17 e 7-12 cm de proteção a partir de uma dose de 500 mg/kg) e com um espectro de ação maior, embora menores quando comparados com a kanamicina,

utilizada como controle. Além disso, os extratos clorofórmicos apresentaram uma atividade mais pronunciada que os extratos de éter de petróleo (RIPA *et al.*, 2009). Pesquisadores brasileiros, também em um estudo etnofarmacológico, avaliaram a atividade leishmanicida de extratos hidroetanólicos de dez plantas medicinais, dentre as quais a *P. edulis*. Esta espécie apresentou uma atividade leishmanicida moderada em relação à forma promastigota do parasita, apesar de ocasionar 100% de inibição de crescimento desta forma. Os autores relacionaram a atividade antimicrobiana observada com a concentração de compostos flavonoídicos e triterpenóides presentes nas folhas de *P. edulis* (BEZERRA *et al.*, 2006)

Um estudo avaliou a atividade antiviral *in vitro* de dois extratos de *Passiflora alata* frente a duas cepas do vírus Herpes simplex tipo I e ao vírus da raiva. O extrato aquoso derivado das raízes se mostrou eficaz contra os três tipos de vírus, com EC₅₀ de 290,9 µg/mL para a cepa do vírus Herpes simplex sensível ao aciclovir, 89,9 µg/mL para o vírus Herpes simplex resistente ao aciclovir e 800 µg/mL para o vírus da raiva. O extrato etanólico de raízes a 40% não se mostrou eficaz. Saponinas e flavonóides, presentes no extrato aquoso foram considerados como responsáveis pela atividade antiviral (MULLER, 2007).

A atividade sobre o sistema gastrointestinal, foco deste trabalho, tem sido pouco explorada. A maior parte dos trabalhos ocorre com estudos etnofarmacológicos, envolvendo ensaios sobre uso popular das plantas. Em um estudo desse tipo ocorrido nos Estados-Unidos, analisou-se a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de partes aéreas de *P. incarnata* frente à bactéria *Helicobacter pylori*, associada à incidência de úlcera gástrica na população mundial. Verificou-se uma atividade antimicrobiana mínima *in vitro* de 50 µg/mL do extrato de *P. incarnata*, concentração semelhante à do metronidazol (MAHADI, 2005).

Estudos sobre a atividade antitumoral de espécies de *Passiflora* têm se mostrado promissores. Em um estudo *in vitro*, avaliou-se a atividade inibitória de decoctos de fruto de duas espécies de *Passiflora* (*P. edulis* e *P. foetida*) frente a metalo-proteases, enzimas associadas com progressão e invasão tumoral, metástase e angiogênese. Os autores verificaram uma inibição dose-

dependente desses extratos frente a metalo-proteases, sendo que o extrato de *P. foetida* apresentou uma inibição maior em menores concentrações (PURICELLI, 2003).

Em um estudo que avaliou a atividade antioxidante de plantas da Caatinga brasileira utilizadas na medicina popular foi verificado que uma espécie de *Passiflora*, *P. cincinnata*, apresentou citotoxicidade pouco expressiva no modelo animal de letalidade de ovas de camarão. Segundo os autores, substâncias que apresentam DL₅₀ superior a 200 mg/L não são promissoras para estudo de citotoxicidade (DAVID *et al.*, 2007). Mais recentemente, um estudo avaliou a citotoxicidade de diferentes extratos de *P. edulis* com o mesmo modelo citado anteriormente. Os pesquisadores observaram uma atividade citotóxica semelhante à do controle estudado, vincristina, nos extratos produzidos a partir do caule da planta, em comparação aos extratos produzidos a partir das folhas sem, no entanto, associar a composição química de cada extrato (RIPA *et al.*, 2009).

2.3.6 OUTRAS ATIVIDADES

Algumas outras atividades estudadas com espécies de *Passiflora* foram avaliadas ao longo dos anos. Podemos citar a ação relaxante sobre o músculo liso, as atividades vasoativa, hepatoprotetora e hipoglicêmica, e alguns ensaios referentes à ação no sistema respiratório.

O princípio ativo relatado por Ruggy e Smith causou hipotensão e cardiomegalia em cães, contração dos músculos lisos de intestino e útero de coelhos e cobaias. Estas atividades não foram afetadas por vagotomia e administração de atropina ou nicotina. Assim, os autores, sugeriram que a substância exerceria ação direta sobre os músculos lisos e afirmaram que a substância isolada não era um alcalóide, mas um glicosídeo de natureza desconhecida (RUGGY & SMITH, 1940). Borgatti (1939) descreveu atividade de paralisia do intestino de coelho e efeito espasmolítico periférico com o resíduo seco do extrato alcoólico de *P. incarnata*.

Em estudo conduzido em cães, FELLOWS e SMITH (1938) detectaram a diminuição da pressão arterial com o extrato aquoso de *P. incarnata*. No entanto, segundo os autores, a substância ativa, solúvel em água, não era um

alcalóide. Apenas em 2000 encontra-se um estudo avaliando a atividade cardiovascular de alcalóides descritos em *Passiflora*. SHI e colaboradores estudaram o efeito cardiovascular *in vivo* e o efeito vasodilatador *in vitro* do alcalóide harmana. A substância, nas doses de 1 a 10 mg/kg, administrada por via intravenosa, produziu hipotensão transiente e bradicardia de longa duração, ambos efeitos dose-dependentes, em ratos anestesiados com pentobarbital. Os autores sugerem que o efeito vasodilatador relaciona-se à liberação de óxido nítrico nas células endoteliais e nos músculos lisos vasculares, inibição das contrações induzidas pela ativação dos canais de cálcio, voltagem-dependentes e ligados a receptores. Segundo os autores, a atividade vasodilatadora pode estar envolvida no efeito hipotensor do alcalóide (SHI *et al.*, 2000). Um estudo que avaliou a mudança parâmetros bioquímicos em ratos após o uso de infuso de folhas de *P. alata* mostrou um aumento nos níveis de HDL-colesterol, sem alterar o colesterol total. Os autores concluíram que esse extrato poderia atuar como anti-aterogênico e cardioprotetor, uma vez que o HDL-colesterol inibe a oxidação do LDL-colesterol (DOYAMA *et al.*, 2005).

Mais recentemente, um estudo realizado com extrato de *P. edulis* em ratos hipertensos demonstrou significativa redução da pressão arterial. Os pesquisadores testaram doses entre 10 e 50 mg/kg do extrato bruto e também de luteolina, um dos compostos identificados no extrato. Apesar da concentração relativamente baixa de luteolina no extrato, os autores correlacionaram a atividade anti-hipertensiva com a presença de flavonóides, e o mecanismo de ação anti-hipertensiva poderia ser devido à atividade GABAérgica e à atividade vasodilatadora dos polifenóis presentes, incluindo luteolina (ICHIMURA *et al.*, 2006). Outro estudo com ratos avaliou a atividade anti-hipertensiva do extrato metanólico das folhas e do suco do fruto de *P. edulis*. O estudo foi conduzido durante um período de dez dias, as doses de ambos os extratos foram de 500 mg/kg, e foi utilizado captopril na dose de 100 mg/kg como controle. O extrato etanólico e o suco do fruto diminuíram a pressão arterial sistólica significativamente desde o primeiro dia de tratamento. O grupo também correlacionou essa atividade com o conteúdo de polifenóis, em especial os flavonóides (ROJAS *et al.*, 2006). Um estudo realizado com extrato da casca do fruto de *Passiflora edulis* Sims mostrou uma atividade anti-hipertensiva parcialmente devida à modulação de óxido nítrico: em um estudo

de quatro semanas, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, em humanos, mostrou uma queda das pressões sanguínea sistólica e diastólica. Esse efeito, segundo os autores, ocorre principalmente devido à presença de bioflavonóides, ácidos fenólicos e antocianinas (ZIBADI, 2007).

Sobre a atividade hepatoprotetora, estudos recentes mostram uma proteção de hepatócitos, em lesão causada por tetracloreto de carbono (BABENKO, 2008). Um estudo em animais mostrou que o extrato hidroetanólico de folhas de *Passiflora alata* reduziu significativamente a hepatotoxicidade mediada por CCl₄, em modelo animal, em todos os parâmetros analisados (alanina amino-transferase, aspartato amino-transferase, superóxido dismutase e atividade de catalase) (RUDNICKI, 2007).

Dois relatos sobre a atividade de extratos de *Passiflora* sobre o sistema respiratório mostram resultados favoráveis. No primeiro estudo, os pesquisadores avaliaram a ação antitussígena do extrato metanólico de *P. incarnata* em camundongos. Com duas doses orais, 100 e 200 mg/kg, e em comparação com codeína, os autores verificaram ação antitussígena no ensaio de exposição a SO₂. Eles concluem que extratos de *P. incarnata* podem ser utilizados na redução da tosse, pois, além de serem eficazes, não apresentam efeitos adversos relacionados com os antitussígenos comercializados (DHAWAN & SHARMA, 2002). No ano seguinte, o mesmo grupo avaliou a atividade antiasmática do mesmo extrato hidroetanólico de *P. incarnata*. Neste caso, os pesquisadores avaliaram três doses (50, 100 e 200 mg/kg) administradas durante uma semana por via oral a cobaias, em um modelo de indução de broncoespasmo por cloreto de acetilcolina. Na dose mais baixa não foi observado efeito; nas duas outras doses, houve diminuição significativa de broncoespasmos, expressa em aumento de tempo pré-convulsivo. Os autores correlacionaram essa atividade às benzoflavonas presentes no extrato, que poderiam atuar como agonistas de receptores alfa-adrenérgicos (DHAWAN *et al.*, 2003).

2.3.7 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

A avaliação toxicológica de extratos vegetais ou de formas não farmacêuticas comercializadas, como chás e suplementos vitamínicos, são

essenciais para garantir a segurança do uso pela população (DOYAMA *et al.*, 2005; CARRASCO *et al.*, 2009). Pesquisadores brasileiros avaliaram a mudança de alguns parâmetros bioquímicos em ratos após o uso três vezes por semana durante 15 dias de um chá preparado a partir das folhas de *P. alata* (dose de 100 mg/kg). Em comparação com o grupo controle, os pesquisadores não observaram variações nos níveis de triacilgliceróis, glicose, proteínas séricas, e enzimas de biotransformação (superóxido dismutase e glutathione peroxidase). A única mudança estatística foi um aumento no HDL-colesterol, a qual os autores relacionaram à ação de flavonóides (DOYAMA *et al.*, 2005). Um estudo conduzido com ratos avaliou a DL₅₀ do extrato etanólico de folhas e suco do fruto de *P. edulis*. Foram administradas doses entre 2.500 e 20.000 mg/kg em dose única. Os pesquisadores verificaram que com as doses maiores, os animais apresentavam sonolência excessiva durante o primeiro dia, e estabeleceram a DL₅₀ para o extrato por volta de 10.000 mg/kg e acima de 20.000 mg/kg para o suco do fruto, mostrando uma certa segurança com relação ao uso desses extratos (ROJAS *et al.*, 2006)

Um estudo pré-clínico avaliou a toxicidade de um fitoterápico composto por *Passiflora incarnata* L., *Crataegus oxyacantha* L. e *Salix alba* L. em camundongos, ratos e cães. Os parâmetros de toxicidade aguda (administração de dose única entre 160 e 5000 mg/kg) foram: triagem farmacológica observacional, dose letal 50% (DL₅₀) e coordenação e atividade motora. Já os parâmetros avaliados na toxicidade crônica (doses diárias entre 160 e 640 mg/kg, durante 180 dias) foram: mudança de pesos, mudança comportamental, fertilidade, genotoxicidade e mutagenicidade. Os autores concluem que o fitoterápico é extremamente seguro, mesmo em doses muito acima das doses terapêuticas (TABACH *et al.*, 2009).

O uso de plantas medicinais pode trazer diversos riscos à saúde, apesar da população acreditar o contrário (FISHER *et al.*, 2000; CARRASCO *et al.*, 2009). Um relato de caso apresentou possível interação medicamentosa entre lorazepam, infusão de *Valeriana officinalis* L. e erva seca de *Passiflora incarnata* L. Os autores sugerem que um efeito sinérgico entre os medicamentos que o paciente fez uso podem ter provocado os efeitos adversos, relacionado com o aumento da atividade inibitória dos benzodiazepínicos que se ligam ao receptor GABA (CARRASCO *et al.*, 2009).

Outro relato de caso, correlacionado com uso em doses terapêuticas de uma formulação comercial de *Passiflora incarnata* L., cita como reações adversas náusea severa, vômito, sonolência, prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma, bradicardia e arritmia ventricular. Os autores relacionaram a presença de flavonóides e alcalóides harmônicos aos efeitos adversos apresentados pela paciente (FISHER *et al.*, 2000).

Recentemente, pesquisadores brasileiros avaliaram a toxicidade de produtos derivados de espécies de *Passiflora* em seres humanos (MEDEIROS *et al.*; 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2009). Em um estudo, foi avaliada a inserção de uma farinha produzida da casca de *Passiflora edulis*, rica em fibras solúveis, na alimentação de 36 voluntários saudáveis. Os voluntários utilizaram dez gramas da farinha três vezes ao dia, durante oito semanas. Não foi evidenciado efeito tóxico em nenhum órgão e sistema estudados, e a aceitabilidade da nova dieta pelos voluntários foi satisfatória. Os autores concluem que esse produto pode ser inserido na alimentação de pacientes diabéticos, e atuaria como agente hipoglicemiante, pela presença em grande quantidade de pectina (MEDEIROS *et al.*, 2009). Em outro estudo foi avaliado um medicamento fitoterápico comercializado, composto por *Passiflora incarnata* L., *Crataegus oxyacantha* L. e *Salix alba* L. O fitoterápico foi administrado durante 28 dias a 24 pacientes, na posologia de dois comprimidos revestidos duas vezes ao dia (correspondente a 400 mg de extrato de *Passiflora incarnata* L. ao dia), e foram avaliados exames clínicos, laboratoriais e eletrocardiográficos, além do levantamento de reações adversas. Os autores concluem que o fitoterápico é seguro na dose estudada, apesar de apresentar uma ocorrência relativamente alta de alguns eventos adversos, dentre os quais podem ser citadas cefaléia, sonolência e febre (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

OBJETIVOS

Geral:

O objetivo do trabalho é realizar o estudo farmacognóstico de *Passiflora serratodigitata* L., nativa da mata Atlântica e cultivada, com direcionamento para a caracterização de flavonóides e atividade antiúlcera.

Específicos:

- Avaliar a presença de grandes grupos de compostos bioativos na droga vegetal e no extrato produzido em laboratório.
- Realizar perfil cromatográfico a partir de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de extrato e frações de extrato de *Passiflora serratodigitata* L.
- Quantificar e isolar flavonóides presentes tanto no extrato bruto quanto nas frações de extrato de *Passiflora serratodigitata* L.
- Formular nanopartículas a partir do extrato bruto e das frações do extrato de *Passiflora serratodigitata* L., avaliar a eficácia do procedimento e aperfeiçoá-lo.
- Realizar triagem farmacológica do extrato bruto, voltada para as atividades antiúlcera, anti-inflamatória e antioxidante.
- Comparar a atividade antiúlcera do extrato bruto e das frações do extrato bruto de *Passiflora serratodigitata* L. em modelos animais de úlcera gástrica.
- Comparar a atividade antiúlcera do extrato bruto e suas frações com e sem formulação de nanopartículas.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PREPARO DO EXTRATO BRUTO

Folhas e caules de *P. serratodigitata* L. foram fornecidos pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). O material foi identificado no próprio IAC, pelo taxonomista Luis Carlos Bernacci. Dados da coleta podem ser consultados através de exsicata depositada no Herbário do IAC, sob número 37969. O material vegetal foi seco em estufa Fabbe® com circulação de ar, a 40°C, e em seguida moído em moinho de facas e martelo Thomas®, passando por tamis de 1 mm.

O extrato hidroetanólico a 60% foi obtido por percolação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1959). O material vegetal ficou em maceração por 24 horas e, em seguida, foi percolado a um fluxo de 30 gotas/minuto. O extrato foi concentrado à pressão reduzida com rotavapor Büchi® a 40-50°C, para evaporação do etanol, e a suspensão restante foi liofilizada (liofilizador Edwards® LK4), resultando no extrato hidroetanólico bruto liofilizado (EB). O EB foi armazenado em dessecador, a pressão reduzida, até o uso nos diferentes ensaios.

4.2. TRIAGEM FITOQUÍMICA

A triagem fitoquímica foi realizada com a droga vegetal (obtida a partir das folhas e caules secos de *Passiflora serratodigitata* L.) e com o EB obtido em laboratório. Os métodos empregados foram preconizados por FARNSWORTH (1966) e MATOS (1988). Todos os solventes e reagentes empregados apresentavam grau PA. Os ensaios, bem como a forma de avaliação deles, estão listados na Tabela 2.

TABELA 2: Triagem fitoquímica realizada na droga vegetal e no extrato bruto de *Passiflora serratodigitata* L.

Grupo de Princípio Ativo	Reações	Negativo	Positivo +	Positivo ++	Positivo +++
Alcalóides	Mayer	Não surgimento de precipitado	Precipitado visto com auxílio de lupa	Precipitado visível a olho nu	Grande formação de precipitado
	Bertrand				
	Dragendorff				
	Bouchardat				
Flavonóides	Hidróxidos alcalinos	Sem modificação	Fraca coloração amarela	Coloração amarela	Intensa coloração amarela
	Shinoda	Sem modificação	Coloração rósea	Coloração rósea escura	Coloração vermelha
	Cloreto de Alumínio	Sem fluorescência	Pequena fluorescência	Fluorescência	Intensa fluorescência
Taninos	Sais de ferro	Não surgimento de precipitado	Precipitado visto com auxílio de lupa	Precipitado visível a olho nu	Grande formação de precipitado
	Acetato de chumbo				
	Acetato de cobre				
	Alcalóides				
Saponinas	Gelatina	Sem indícios de espuma	Espuma persistente por 30 segundos	Espuma persistente por um minuto	Espuma persistente por mais de um minuto
	Persistência de espuma				
Antraquinonas	Bornträeger	Sem mudança na coloração	Aquoso: leve coloração vermelha Etéreo: incolor	Aquoso: vermelho translúcido Etéreo: incolor	Aquoso: vermelho intenso Etéreo: incolor

4.3. PERFIL CROMATOGRÁFICO

Para a realização do perfil cromatográfico e da identificação dos compostos, foi realizado um fracionamento do EB de acordo com o fluxograma abaixo (FIGURA 4).

FIGURA 4: Fracionamento, de acordo com práticas usuais do laboratório, do extrato hidroetanólico bruto liofilizado (60% v/v) de *Passiflora serratodigitata* L., obtendo-se as frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e aquosa.

4.3.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Foi realizada cromatografia em camada delgada para verificar o perfil cromatográfico tanto no EB quanto nas frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e aquosa residual. A cromatografia foi direcionada para compostos fenólicos. As placas cromatográficas foram preparadas no próprio laboratório sobre placas de vidro. O sistema de cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizado de acordo com o padrão a seguir:

- **Tamanho da placa:** 15x20 cm;
- **Fase estacionária:** Sílica GF₂₅₄ (Merck);
- **Espessura:** 500 µm;
- **Ativação:** Estufa a 110°C, durante uma hora;
- **Saturação da cuba:** Total
- **Desenvolvimento:**
 - Distância: 12,5 cm;
 - Sentido: ascendente
- **Amostras:** EB, frações diclorometano, acetato de etila, hexânica e aquosa
- **Padrões:** Ácido gálico, rutina, quercetina, vitexina, apigenina (0,1%).
- **Quantidade aplicada:** 6 µL para as amostras, cerca de 3 µL para os padrões.

Foram realizadas cromatografias para verificar a presença de taninos e flavonóides, segundo descrito na tabela 2 (WAGNER, 1996):

TABELA 3: Sistemas cromatográficos em camada delgada utilizados na caracterização do extrato bruto e frações de *P. serratodigitata* (adaptados de WAGNER, 1996).

Substância	Fase móvel	Deteção	Padrões
Taninos	Clorofórmio	Cloreto Férrico III 2% em	Ácido gálico
	Acetona	metanol	
	Ac. fórmico	Visualização à luz do dia	
	(75;16,5;8,5)		
Flavonóides	Clorofórmio	Solução NP	Rutina
	Acetona	Visualização em UV 365	Quercetina
	Ac. fórmico	nm	Vitexina
	(75;16,5;8,5)		
Flavonóides	Acetato de etila	Solução NP	Apigenina
	Ácido fórmico	Visualização em UV 365	Quercetina
	Ac. acético glacial	nm	
	Água (100:11:11:26)		

4.3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método físico-químico que apresenta alta seletividade, precisão e exatidão além de manter a integridade da amostra no extrato (ABOURASHED *et al.*, 2002).

As amostras foram analisadas em cromatógrafo analítico Shimadzu®, composto por bomba LC-10ADVP, câmara de mistura e degaseificador DGU-14A acoplados, injetor manual 7725i, detector espectrofotométrico por arranjo de diodos modelo SPD-M10AVP, coluna Shim-pack® VP-ODS, 5 µm (4,6 x 250 mm), precedido por pré-coluna PREP ODS 20 x 250 mm. O aparelho foi conectado a um computador comportando o software “Multi System” Class VP® 6.12.

A escolha da fase móvel adequada, bem como os comprimentos de onda para a detecção dos compostos, foi baseada em ensaios iniciais, após revisão bibliográfica de metodologias (LI *et al.*, 2009; MULLER *et al.*, 2005; ABOURASHED *et al.*, 2002).

4.4. ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE COMPOSTOS

Após o perfil estabelecido em cromatógrafo analítico, foi realizada cromatografia preparativa em cromatógrafo semi-preparativo Shimadzu® composto por bomba, coluna Shim-pack® VP-ODS 5 µm (4 x 25 cm) e detector UV-VIS. A comparação entre o cromatograma analítico e o preparativo permitiu a separação manual dos compostos, cujos solventes foram posteriormente submetidos à evaporação do solvente orgânico em rotavapor Büchi® a 40-50°C, e liofilização em liofilizador Edwards® LK4.

Com o isolamento realizado, passou-se à elucidação química dos compostos. Foi realizada ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C de cada composto isolado, nas seguintes condições: os espectros de RMN foram gravados em soluções de CDCl_3 ou $\text{DMSO}-d_6$, usando um espectrômetro Varian INOVA® 300 operando em 300 MHz para ^1H e 75.5 MHz para ^{13}C . Os deslocamentos químicos foram dados em δ (ppm) usando TMS como padrão externo.

Como controle, determinou-se o perfil cromatográfico em CLAE da substância isolada no mesmo sistema analítico citado anteriormente.

4.5. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES

A quantificação de flavonóides do extrato bruto e das frações do extrato foi realizada a partir da reação de complexação com cloreto de alumínio (ver figura 5). Trata-se de uma técnica modificada da Farmacopéia Francesa, analisada por POZZI, em 2007. A quantificação foi realizada em placa de 96 poços e determinada em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek®, no comprimento de onda de 430 nm. Os resultados foram expressos em concentração (micrograma de flavonóides por miligrama de produto) e porcentagem. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

FIGURA 5: Reação de complexação de flavonóides com cloreto de alumínio, realizada na quantificação de flavonóides no extrato bruto e frações de *Passiflora serratodigitata* L.

4.6. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A determinação da atividade antioxidante foi realizada *in vitro* através do método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), preconizado por MENSOR (2001) e SCHMEDA-HIRSCHMANN (2003).

O radical DPPH (figura 6) é um radical livre estável à temperatura ambiente que produz uma solução violácea em etanol. Em presença de substâncias antioxidantes o DPPH é reduzido e a solução etanólica torna-se incolor (MENSOR *et al.*, 2001). A capacidade dos extratos vegetais liofilizados de reduzir o radical livre DPPH foi avaliada nos ensaios através da perda da

coloração das soluções. O padrão utilizado nos ensaios foi o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®).

Para este ensaio foram utilizados como amostras o EB de *P. serratodigitata*, e as frações diclorometano, acetato de etila e aquosa residual. Cada amostra foi processada em triplicata, sendo inicialmente dissolvida no seu solvente de origem, na concentração inicial de 1 mg/mL. Uma diluição seriada foi realizada com cada amostra com metanol: água 80% v/v, observando-se a eventual formação de precipitado. As diluições do padrão foram obtidas de modo semelhante, sendo a solução inicial preparada também com metanol: água 80% v/v. A amostra utilizada como branco foi preparada com o solvente (metanol: água 80% v/v), e a amostra de controle, com o DPPH, de acordo com a Tabela 4.

A solução de DPPH foi preparada em metanol 80%, e sua concentração foi de 100 µM. Todo o processamento para a obtenção desta solução, e a manipulação durante o experimento foram realizados na ausência de luz. As amostras foram preparadas em placa de 96 poços e lidas em leitor espectrofotométrico Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek®, no comprimento de onda de 517 nm, após duas horas de reação em ausência de luz.

TABELA 4: Composição do meio reacional no ensaio de determinação de atividade antioxidante de extrato bruto e frações de *Passiflora serratodigitata* L. com DPPH.

Amostra	Volume de amostra	Volume de DPPH
Teste	50 µL	150 µL
Branco	200 µL MeOH:água	-
Trolox®	50 µL	150 µL
Controle	50 µL MeOH:água	150 µL

FIGURA 6: Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH) por compostos fenólicos (ROH).

A concentração média efetiva (*median effective concentration*), EC_{50} , é definida como a concentração suficiente para obtenção de 50% de um efeito máximo estimado em 100%. Na abscissa foi representada a concentração das amostras e do controle e, na ordenada, o percentual médio de atividade antioxidante, a partir de três ensaios, realizados em períodos distintos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os valores obtidos de EC_{50} foram expressos como a média das leituras $\pm$ erro padrão. Os valores foram obtidos por regressão linear, com um limite de confiança de 95%.

4.7. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Os ensaios de atividade anti-inflamatória foram realizados em ratos Wistar, de acordo com o protocolo experimental a seguir. Os ensaios foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, protocolo CEEA n°234 (em anexo).

4.7.1 INDUÇÃO DO EDEMA DE PATA TRASEIRA

Os animais, pesando entre 180 e 220g, receberam por gavagem, 30 minutos antes da indução do edema de pata, 200 e 400mg/kg do extrato bruto e água (controle negativo) no volume de 1ml/100g de animal, sendo 5 animais por grupo. A seguir, foram anestesiados transitoriamente com a mistura de ketamina e xilazina (por inalação embebida em gaze). Em seguida, a medida basal das patas traseiras dos animais (esquerda e direita) foi avaliada com o auxílio do hidropletismômetro (Ugo Basile 7140, Comerio, Itália). A seguir, a injeção intraplantar (i.pl., 50 - 100 µl) do estímulo inflamatório (carragenina 1%) foi realizada na pata posterior esquerda. Após intervalos de 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5 e 24 h, as medidas foram realizadas na pata posterior esquerda. Ao término do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia por superdosagem anestésica. O edema de pata foi expresso em diferença de volume (ml) (ESQUISATTO *et al.*, 2001; YSHII *et al.*, 2009).

4.7.2 AUMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR/EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO

Os animais, ratos machos, com 180 a 220g, receberam por gavagem, 30 minutos antes da indução do edema de pele, 400mg/kg do extrato bruto e água (controle negativo) no volume de 1ml/100g de animal, e foram anestesiados com mistura de xilazina (20 mg/kg) + ketamina (80 mg/kg) pela via intraperitoneal, sendo 5 animais por grupo. Em seguida, os animais foram injetados, pela via endovenosa, com albumina bovina marcada com I¹²⁵ (BSA 0.09 MBq – 100 µl/animal).

A pele dorsal foi depilada e a injeção intradérmica (i.d.) dos diferentes agentes inflamatórios (bradicinina, histamina e substância P) foi feita aleatoriamente (100 µl/sítio), conforme doses de literatura (1 nmol/sítio) (ver figura 7; ESQUISATTO *et al.*, 2001; YSHII *et al.*, 2009), no máximo, de seis sítios por rato. Após o intervalo de 40 minutos, foi coletada uma amostra de sangue (0,5 – 1 ml) via punção cardíaca e depois submetida à centrifugação (10,000g, 5 minutos). Os animais foram submetidos ao deslocamento cervical,

a pele dorsal destes foi removida e os sítios injetados foram obtidos com um cortador específico (6-15 mm) e transferidos para tubos plásticos. O volume de 100 µL do plasma obtido da centrifugação da amostra de sangue da punção cardíaca foi disposto em tubo plástico e levado juntamente com os sítios para o contador gama. A medida de extravasamento plasmático na pele foi calculada em relação à contagem (cpm) obtida no volume de 100 µL do plasma (ESQUISATTO *et al.*, 2001; YSHII *et al.*, 2009).

Rato Wistar (200-250 g)

FIGURA 7: Esquema do modelo de permeabilidade vascular (extravasamento plasmático) no ensaio de atividade anti-inflamatória do extrato bruto de *Passiflora serratodigitata* L.

4.8. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

Para formulação da suspensão de nanopartículas, utilizaram-se como substâncias ativas o EB e a fração acetato de etila obtida a partir do fracionamento do EB. O polímero utilizado como matriz para a formação das nanopartículas foi a poli(ε-caprolactona), com peso molecular aproximado de 65.000 Daltons (Aldrich, Estrasburgo, França). Os tensoativos utilizados foram o monoestearato de sorbitano (Span 60[®])- E.H.L = 4,7 (Delaware, Porto Alegre,

Brasil), para a fase oleosa; e o polissorbato 80 (Tween 80®)- E. H. L. = 15,0 (Delaware, Porto Alegre, Brasil). Finalmente, utilizou-se uma mistura de triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (Brasquim, Porto Alegre, Brasil), como matriz oleosa das nanopartículas.

4.8.1 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS

Para a obtenção das nanopartículas contendo o EB ou a fração acetato de etila de *Passiflora serratodigitata*, foi utilizado o método de precipitação de polímero pré-formado que consiste na adição, sob agitação constante, da fase orgânica contendo o polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL), acetona, o monoestearato de sorbitan, a mistura de triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (Miglyol® 810) e a substância ativa sobre fase aquosa contendo polissorbato 80 (verificar Tabela 5). A eliminação do solvente e parte da água foi efetuada empregando evaporador rotatório a pressão reduzida e o volume da suspensão foi ajustado em balão volumétrico (BECK *et al.*, 2004). Após preparo, a suspensão de nanopartículas foi armazenada em geladeira a 8°C, até o uso. Quando usadas para os ensaios farmacológicos, as formulações foram preparadas com 24 horas de antecedência para volume final de 20 mL, em material e vidraria separados exclusivamente para realização de ensaios com animais.

TABELA 5: Fórmula das nanocápsulas obtidas pelo método de precipitação de polímero pré-formado contendo o extrato bruto ou a fração acetato de etila de *Passiflora serratodigitata* L. para volume final de 10 mL.

FASE ORGÂNICA	
Componente	Peso (g) para volume final de formulação de 10 mL
Poli(ϵ -caprolactona)	0,100
Monoestearato de sorbitan (span 60)	0,077
Triésteres de glicerol dos ácidos cáprico e caprílico (Miglyol®)	0,333
Extrato (20 mg/mL) ou Fração Acetato de Etila (5 mg/mL)	1,00
Acetona P.A. (mL)	27,0
FASE AQUOSA	
Componente	Peso (g) para volume final de formulação de 10 mL
Polissorbato 80	0,077
Água purificada (mL)	53,0

4.8.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS

A caracterização física das suspensões foi efetuada conforme descrito por SCHAFFAZICK *et al.* (2003).

O diâmetro das partículas em suspensão foi determinado por espalhamento de luz dinâmica diluindo-se as amostras (20 μ L para 2,0 mL de água purificada filtrada empregando membrana éster de celulose tamanho de poro 0,22 μ m) e observando-se a luz espalhada em ângulo de 90 °C. Os resultados corresponderam à média de três determinações. O tamanho das partículas foi determinado empregando equipamento N5 Submicron Particle Size Analyser (Beckman, Coulter). As amostras foram medidas em suspensão, após a preparação.

O potencial Zeta foi medido empregando equipamento Zetasizer 3000® (Malvern Instruments, Malvern, UK). As amostras foram diluídas em água destilada estéril antes da medição visando à otimização da intensidade do sinal. Para cada amostra foram efetuadas dez medições, e a média resultante foi utilizada nos cálculos adicionais.

4.8.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

A eficiência de encapsulamento foi relacionada com a concentração flavonóides do EB e da fração acetato de etila das folhas e caules de *Passiflora serratodigitata* L. ligada ao sistema nanoparticulado. Ela foi avaliada por meio da transferência de 200 µL da suspensão para ultrafiltro Microcon Ultracel YM-10 (Regenerated cellulose 10.000 MWCO) Millipore® e centrifugação empregando equipamento Eppendorf® Centrifuge 5804 R a 8.000 rpm por 30 minutos. Uma alíquota obtida do filtrado (teor do fármaco não ligado à partícula) foi analisada empregando método espectrofotométrico (verificar item 4.5). Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao teor de flavonóides medido nos extratos não encapsulados.

4.9. ATIVIDADE ANTIÚLCERA

O ensaio de atividade antiúlcera foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, protocolo CEEA n°234 (em anexo). O estudo da lesão gástrica aguda foi realizado segundo metodologia preconizada por MIZUI & DOTEUCHI (1983).

Nos ensaios foram utilizados sete ratos *Wistar* fêmeas, em cada grupo experimental, pesando entre 150 e 180 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP. Os animais permaneceram em jejum por 12 horas antes do experimento. Aos animais foram administrados, por via oral, água (grupo controle), lansoprazol na dose de 30mg/kg (grupo de referência), e as amostras estudadas (apresentados na Tabela 6). Após 30 minutos, todos os animais receberam 1 mL/100g (via oral) de solução 0,3 M de HCl em etanol a 60% como agente ulcerogênico. Após uma hora, os animais foram mortos em câmara de CO₂, seus estômagos retirados, abertos ao longo

da grande curvatura, lavados com água corrente, prensados entre duas placas de vidro e suas áreas medidas através do programa *Image pro plus®*.

A análise destes resultados foi realizada considerando os seguintes parâmetros (GONZALEZ, 2001): Área Total de Lesão Ulcerativa (ATLU) em mm^2 , calculada pela somatória das áreas de lesão individuais; Área Relativa de Lesão Ulcerativa (ARLU) que se refere à porcentagem de área ulcerativa (p) em relação à área total do estômago e porcentagem de proteção, que se refere à porcentagem de lesão não formada em relação ao controle negativo. Esta porcentagem foi transformada em arcoseno pela fórmula: $p' = \arcsen p$, para se proceder a análise estatística adequada.

TABELA 6: Produtos derivados de folhas e caules de *Passiflora serratodigitata* utilizados nos ensaios de atividade antiúlcera, com as respectivas doses utilizadas.

Amostra – Teste	Doses
Extrato hidroetanólico (60% v/v)	100, 200 e 400 mg/kg
Fração Acetato de Etila	50, 100 e 200 mg/kg
Fração Aquosa Residual	50, 100, e 200 mg/kg
Suspensão de nanopartículas contendo o extrato hidroetanólico (60% v/v)	Equivalente a 200 mg/kg do extrato hidroetanólico (60% v/v)
Suspensão de nanopartículas contendo a fração acetato de etila	Equivalente a 5 mg/kg da fração acetato de etila

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios biológicos foram analisados por meio de Análise de Variância, seguida do Teste Tukey para análise de dados paramétricos ou Kruskal Wallis (Dunn) para dados não paramétricos, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

5.1. TRIAGEM FITOQUÍMICA E PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CCD

Através da triagem fitoquímica da droga vegetal e EB de *Passiflora serratodigitata*, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 7:

TABELA 7: Resultado da triagem fitoquímica da droga vegetal (folhas e caules secos) e extrato bruto de *Passiflora serratodigitata* L.

<i>Teste</i>	<i>Droga Vegetal</i>	<i>Extrato Bruto</i>
ALCALÓIDES		
Reativo de Bertrand	+++	+++
Reativo de Bouchardat	+++	+++
Reativo de Dragendorff	++	+++
Reativo de Mayer	+++	+++
SAPONINAS		
Persistência de espuma	-	-
ANTRAQUINONAS		
Reação de Bornträeger	-	-
FLAVONÓIDES		
Reação com cloreto de alumínio	+++	+++
Reação de Shinoda	+++	+++
Reação com hidróxidos alcalinos	+++	+++
TANINOS		
Reação com sais de ferro	++	++
Reação com acetato de cobre	+++	+++
Reação com alcalóide	++	+++
Reação com gelatina	++	++

Cada teste foi realizado em triplicata. -: não reativo; +: reatividade leve; ++: reatividade moderada; +++: reatividade forte. Para detalhes da classificação de reatividade para cada teste, consultar TABELA 1.

TABELA 8: Rendimento (em relação à massa de extrato bruto) das frações preparadas a partir de 80g do extrato bruto de folhas e caules de *Passiflora serratodigitata* L.

Fração	Massa da fração (g)	Rendimento (%)
Hexano	0,4668	0,5
Diclorometano	0,5905	0,7
Acetato de etila	8,3294	9,5
Aquoso	54,0252	61,4
TOTAL	63,4119	72,0

Pelos resultados da triagem fitoquímica, apresentados na tabela 6, afirma-se que tanto a droga vegetal quanto o extrato bruto possuem alcalóides, flavonóides e taninos. Em contrapartida, não foram encontradas cumarinas ou saponinas.

O preparo do extrato bruto, visando o fracionamento, foi realizado na proporção de cem gramas de extrato para um litro de líquido extrator. A Tabela 8 apresenta o rendimento do fracionamento realizado com o extrato bruto. Observa-se que as frações acetato de etila e aquosa residual foram as que obtiveram um rendimento mais significativo.

O cromatograma obtido para o extrato bruto e as diferentes frações, com revelação pela solução NP (revelador de flavonóides), acusa uma mancha relativamente grande na fração acetato de etila, seguida por duas manchas menores (todas elas com coloração amarelada, indicativa para flavonóides). Este cromatograma está ilustrado na figura 8, e os resultados dos fatores de retenção das manchas estão apresentados na tabela 8. O cromatograma realizado para verificar a presença de taninos (revelado com cloreto férrico) acusou as mesmas zonas do cromatograma da figura 8, não indicando, portanto, a presença significativa de taninos.

FIGURA 8: Perfil cromatográfico com identificação para flavonóides realizado com produtos de *Passiflora serratodigitara* L. Fase móvel: Clorofórmio, acetona, ácido fórmico (75;16,5;8,5), fase estacionária: Silicagel G. A: Extrato bruto; B: Fração hexânica; C: Fração diclorometano; D: Fração acetato de etila; E: Fração aquosa; F: Padrão rutina. Visualização: UV 365 nm (direita), negativo da foto (esquerda). Os números na figura à esquerda referem-se às bandas representada na Tabela 9.

TABELA 9: Fator de retenção (Rf) e coloração no UV das zonas mais marcantes do cromatograma representado na FIGURA 8. A: Extrato bruto; B: Fração hexânica; C: Fração diclorometano; D: Fração acetato de etila; E: Fração aquosa; F: Padrão rutina.

<i>Banda</i>	<i>Valor de Rf*</i>	<i>Coloração (UV 365)</i>	<i>Localização no sistema</i>
1	0,78	Amarela	D
2	0,68	Azul	B, C, D
3	0,62	Verde-amarelada	C, D
4	0,44	Amarela	A, B, D
5	0,28	Amarela	D
6	0,18	Amarela	D
7	0,07	Azul	A, B, D, E

*: Valores calculados considerando uma corrida total de 12,5 cm.

5.2. PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CLAE, ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE COMPOSTOS

Foi realizada análise por CLAE das frações diclorometano, acetato de etila e aquosa residual do EB. Não foi realizado perfil cromatográfico da fração hexânica, pois esta fração foi produzida com o intuito de eliminar compostos como clorofila das amostras. A fração acetato de etila apresentou três picos majoritários, com pureza qualitativamente elevada. Tanto a fração aquosa quanto a fração diclorometano apresentaram dois picos majoritários, também com pureza qualitativamente elevada. A fase móvel foi realizada com gradiente de solventes, com as seguintes características (A: acetonitrila; B: ácido trifluoracético 0,1% em água Milli-Q): 0-5 min: 20% A, 80% B; 5-55 min gradiente até 70% A, 30% B; 55-60 min: 70% A 30% B; 60-70 min: gradiente até 20% A 80% B. Em todas as corridas apresentadas, o fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min.

Verifica-se, a partir dos cromatogramas ilustrados nas figuras 9, 10 e 11, que existem cinco compostos majoritários nos produtos derivados de folhas e caules de *Passiflora serratodigitata*. Um desses compostos, identificado nas figuras 9 e 10, teve seu espectro analisado (figura 13). Sua estrutura foi identificada como o neoflavonóide 5-glico-7-metil-4-fenil-4a,8a-di-hidrocromen-2-ona.

FIGURA 9: Cromatograma em CLAE da fração acetato de etila de *P.serratadigitata*. Em 1, 2 e 3, estão representados a varredura de absorção em diferentes comprimentos de onda (acima) e o espectro de absorção em UV em 254 nm (abaixo) respectivamente dos picos 1, 2 e 3. Verificar condições cromatográficas no item 5.2.

FIGURA 10: Cromatograma em CLAE da fração aquosa (detecção em 254 nm). Em 4 e 5 estão representados a varredura de absorção em diferentes comprimentos de onda (acima) e o espectro de absorção em UV em 254 nm (abaixo) de cada pico. Verificar as condições cromatográficas no item 5.2.

FIGURA 11: Cromatograma em CLAE da fração diclorometano (detecção em 254 nm). Em 6 e 7 estão representados a varredura de absorção em diferentes comprimentos de onda (acima) e o espectro de absorção em UV em 254 nm (abaixo) de cada pico. Verificar as condições cromatográficas no item 5.2.

1 PDA Multi 1/254nm 4nm

FIGURA 12: Cromatograma em CLAE da fração 5-1, isolada da fração acetato de etila, correspondente ao pico 1 da FIGURA 9 (detecção em 254 nm). Em A está representado o espectro de absorção em UV do pico majoritário. Condições cromatográficas: fase móvel em fluxo isocrático Acetonitrila: Ácido trifluoracético 0,1% 25:75, tempo de corrida de 45 minutos.

FIGURA 13: Espectro de RMN gravado em soluções de CDCl_3 ou $\text{DMSO}-d_6$, operando em 300 MHz para ^1H (à esquerda) e 75.5 MHz para ^{13}C (à direita). Os deslocamentos químicos foram dados em δ (ppm) usando TMS como padrão externo. Ao centro: proposta da estrutura do composto isolado (5-glico-7-metil-4-fenil-4a,8a-di-hidrocromen-2-ona).

5.3. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES

O ensaio de quantificação de flavonóides foi realizado para o extrato bruto e para as frações diclorometano, acetato de etila e aquosa residual. Um novo ensaio era realizado sempre que um novo fracionamento fosse realizado. A determinação foi realizada a partir da curva de calibração com o flavonóide quercetina. Os resultados estão apresentados na Figura 14 e na Tabela 10.

A fração diclorometano apresentou problemas de dissolução, além da presença de outros compostos cromóforos (como clorofila), tornando os resultados pouco confiáveis.

TABELA 10: Quantificação de flavonóides totais em produtos derivados de folhas e caules de *Passiflora serratodigitata* L., pelo método espectrofotométrico de complexação com cloreto de alumínio. Cada valor é a média de 6 dados, acompanhado de seu erro-padrão.

<i>Amostra</i>	<i>Concentração (mcg/ml)</i>	<i>Flavonóides Totais (mcg/mg extrato)</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
Extrato Bruto	584,98 ± 30,68	116,99 ± 6,14	11,7 ± 0,6
Fração Aquosa Residual	162,63 ± 14,74	32,53 ± 2,95	3,27 ± 0,29
Fração Acetato de Etila	526,74 ± 22,93	105,5 ± 4,59	10,53 ± 0,44

FIGURA 14: Curva-padrão de quercetina utilizada para o ensaio de quantificação de flavonóides totais no extrato bruto e frações de *Passiflora serratodigitata* L. Ao lado: equação da reta de tendência e valor de R^2 . Cada triplicata de amostra foi lida três vezes.

5.4. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A atividade antioxidante foi determinada para o EB e para as frações acetato de etila e aquosa residual. Os resultados encontram-se nas Figuras 15, 16, 17, 18 e 19 e Tabela 11.

FIGURA 15: Curva-padrão de Trolox® utilizada no ensaio de atividade antioxidante de extrato bruto e frações de *Passiflora serratodigitata* L. Ao lado: equação da reta de tendência e valor de R^2 . Cada triplicata de amostra foi lida três vezes.

TABELA 11: Concentração Eficaz 50% (CE_{50}) média do extrato bruto e frações de *Passiflora serratodigitata* no ensaio de atividade antioxidante. Cada dado é acompanhado de seu erro-padrão. . Cada triplicata de amostra foi lida três vezes.

<i>Produto</i>	<i>CE_{50} (mcg/mL $\pm$ erro padrão)</i>
Extrato Bruto	102,40 $\pm$ 9,32
Fração Acetato de Etila	77,31 $\pm$ 7,68
Fração Aquosa Residual	338,41 $\pm$ 31,12
Trolox®	11,02 $\pm$ 0,94

FIGURA 16: Curva-padrão de atividade antioxidante de acordo com a concentração de Trolox®. Os dados são acompanhados por linha de tendência com equação e valor de R^2 . Cada triplicata de amostra foi lida três vezes.

FIGURA 17: Atividade antioxidante de acordo com a concentração de extrato bruto de *Passiflora serratodigitata* L. Os dados são acompanhados por linha de tendência com equação e valor de R^2 . Cada triplicata de amostra foi lida três vezes.

FIGURA 18: Atividade antioxidante de acordo com a concentração da fração acetato de etila de *Passiflora serratodigitata*. Os dados são acompanhados por linha de tendência com equação e valor de R^2 . Cada triplicata de amostra foi lida três vezes.

FIGURA 19: Atividade antioxidante de acordo com a concentração da fração aquosa de *Passiflora serratodigitata*. Os dados são acompanhados por linha de tendência com equação e valor de R^2 . Cada triplicata de amostra foi lida três vezes.

5.5. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*

A determinação da atividade anti-inflamatória a partir do modelo de indução de edema em pata foi avaliada com as duas doses que apresentaram resultados estatísticos muito significantes ($p < 0,01$) no ensaio de atividade antiúlcera, ou seja, as doses de 200 e 400 mg/kg. Os resultados estão apresentados na figura 20. Os resultados, apresentados abaixo, sugerem que há uma inibição da produção de edema apenas na dose de 400 mg/kg, e essa atividade torna-se estatisticamente significativa, a partir da quinta hora após a aplicação da carragenina.

FIGURA 20: Deslocamento de água produzido por edema em pata de rato, para cada grupo, controle (água) e EB de *P. serratodigitata* (em duas doses) de acordo com o tempo após injeção dos testes; *: $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. N= 7 para cada grupo.

A partir dos resultados acima, apenas a dose de 400 mg/kg foi utilizada para avaliar a inibição das substâncias pró-inflamatórias no modelo de indução de edema de pele por permeabilidade vascular (Tabela 12). Segundo os resultados abaixo, o EB na dose de 400 mg/kg não inibiu a ação de nenhum mediador inflamatório utilizado (substância P, bradicinina e histamina).

TABELA 12: Média de valores de contagem (cpm) de contador gamma em 100 mL de plasma de ratos $\pm$ erro padrão no ensaio de indução de edema de pele, segundo grupo (controle com água e extrato bruto de *Passiflora serratodigitata* na dose de 400 mg/kg) e substância pró-inflamatória. Os resultados não foram estatisticamente significantes. N= 5 para cada grupo.

Grupo	Substância P	Bradicinina	Histamina	Controle
Controle	14,09 $\pm$ 1,67	13,48 $\pm$ 2,47	8,03 $\pm$ 1,08	4,13 $\pm$ 1,10
400 mg/kg	11,38 $\pm$ 2,73	14,28 $\pm$ 1,91	5,73 $\pm$ 1,30	5,27 $\pm$ 1,04

5.6. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

No preparo das nanopartículas contendo o extrato hidroetanólico, foi necessário filtrar o EB em filtro Millipore® 0,45 mm, após solubilização em acetona. No caso das nanopartículas contendo a fração acetato de etila, não foi necessária a filtração, pois a fração foi totalmente solúvel. Na Tabela 13 são apresentados os parâmetros físico-químicos de cada uma das nanopartículas preparadas.

TABELA 13: Parâmetros físico-químicos de caracterização dos sistemas nanoparticulados, de acordo com o ativo incorporado. Nanopartícula branca: não houve incorporação de ativo.

Nanopartícula	Tamanho de partícula (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulamento (%)
Extrato Bruto	379,2 $\pm$ 16,4	0,253 $\pm$ 0,021	-20,2 $\pm$ 1,8	90,6
Fração Acetato de Etila	383,8 $\pm$ 18,2	0,353 $\pm$ 0,034	-27,3 $\pm$ 1,1	79, 9
Branca	245,1 $\pm$ 10,2	0,172 $\pm$ 0,009	-53,6 $\pm$ 2,9	N/D

N/D: medida não realizada.

5.7. ATIVIDADE ANTIÚLCERA

Cada ensaio de atividade antiúlcera foi realizado em dias diferentes. Para reduzir ao máximo as variáveis externas dos ensaios, todos eles foram realizados no mesmo dia da semana, dentro da mesma sala de experimentação do Biotério do Conjunto das Químicas. Os animais foram deixados em jejum no dia anterior, sempre no mesmo horário. Após a realização dos ensaios, os estômagos foram processados da mesma maneira: após o plaqueamento dos estômagos, os mesmos foram fotografados, e os resultados foram processados no mesmo dia. Os resultados estão apresentados nas figuras 21, 22 e 23, em média de área relativa de lesão ulcerativa, com seus respectivos erros-padrão.

FIGURA 21: Atividade antiúlcera do extrato bruto de *Passiflora serratodigitata* L. Em A, B, C, D e E estão representados estômagos característicos respectivamente de cada grupo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ em relação ao controle negativo ($n=7$ para cada grupo); Dose de lansoprazol: 30mg/kg.

FIGURA 22: Atividade antiúlcera comparativa entre extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa residual de *Passiflora serratodigitata* L. Em A, B, C, D e E estão representados estômagos característicos respectivamente de cada grupo; ***: $p < 0,001$ em relação ao controle negativo ($n=7$ para cada grupo); Dose de lansoprazol: 30 mg/kg.

FIGURA 23: Comparação entre atividade antiúlcera da fração acetato de etila (barras claras) em comparação com a fração aquosa residual (barras escuras) de *Passiflora serratodigitata* L. Em A, B, C, D e E estão representados estômagos característicos respectivamente de cada grupo (acima: fração acetato de etila e abaixo: fração aquosa); *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ em relação ao controle negativo ($n=7$ para cada grupo); Dose de lansoprazol: 30 mg/kg.

5.8 COMPARAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIÚLCERA ENTRE FORMULAÇÕES NANOENCAPSULADAS E EXTRATOS NÃO ENCAPSULADOS

Para avaliar a atividade da formulação nanoencapsulada frente à administração do extrato em água, foi realizado um ensaio antiúlcera envolvendo o EB não encapsulado, na dose de 200 mg/kg, o EB encapsulado na mesma dose e uma formulação das nanopartículas sem o ativo, utilizada como branco (figura 24) e um ensaio envolvendo a fração acetato de etila não encapsulada na dose de 50 mg/kg e encapsulada, na dose de 5 mg/kg (figura 25). Na Tabela 14 encontra-se um resumo da porcentagem de proteção de cada produto derivado de *Passiflora serratodigitata* L.

TABELA 14: Porcentagem de proteção gástrica (em relação ao controle negativo) de diferentes doses de produtos de *Passiflora serratodigitata* L.

Produto	Dose	Porcentagem de proteção*
Extrato Bruto	400 mg/kg	75,5%
	200 mg/kg	75,8%
	100 mg/kg	72,6%
Fração Acetato de Etila	200 mg/kg	81,4%
	100 mg/kg	98,6%
	50 mg/kg	95,7%
Fração Aquosa Residual	200 mg/kg	93,0%
	100 mg/kg	71,5%
	50 mg/kg	49,3%
Nanocápsulas contendo o Extrato Bruto	200 mg/kg	91,4%
Nanocápsulas contendo a fração Acetato de Etila	5 mg/kg	93,2%

*: porcentagem de proteção considerando o controle negativo como não proteção.

FIGURA 24: Atividade antiúlcera comparativa entre o extrato bruto de *Passiflora serratodigitata* L. encapsulado e não encapsulado. Em A, B, C, D e E estão representados estômagos característicos respectivamente de cada grupo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ em relação ao controle negativo ($n=7$ para cada grupo).

FIGURA 25: Atividade antiúlcera comparativa entre a fração acetato de etila de *Passiflora serratodigitata* L. encapsulada (dose de 5 mg/kg) e não encapsulada (dose 50 mg/kg). Em A, B, C, D e E estão representados estômagos característicos respectivamente de cada grupo; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ em relação ao controle negativo ($n=7$ para cada grupo).

DISCUSSÃO

As plantas medicinais constituem uma fonte de grande diversidade de compostos químicos e produtos naturais que apresentam alta relevância na descoberta de novos fármacos (KOHEN, 2005). Apesar de um período recente no qual o interesse da indústria farmacêutica por modelagem molecular, química combinatória entre outras técnicas para a produção de compostos sintéticos foi destacado, os produtos naturais, sobretudo os provenientes de plantas medicinais, continuam sendo uma importante fonte de novas moléculas. Em 2001 e 2002, cerca de um quarto dos fármacos mais vendidos mundialmente, eram produtos naturais ou derivados destes (BALUNAS, 2005). A revisão de literatura apresentada neste trabalho revela que grande parte dos estudos sobre o gênero *Passiflora* relaciona-se ao isolamento e à elucidação da estrutura dos diversos compostos; entretanto, poucos são os relatos que apresentam relação entre ensaios farmacológicos e estudos fitoquímicos. Ademais, a maior parte dos estudos farmacológicos do gênero dirige-se às atividades sobre o sistema nervoso central, destacando-se a atividade ansiolítica e sedativa.

Uma vantagem apresentada por produtos fitoterápicos é a possibilidade de uma extensa variedade de efeitos farmacológicos em comparação a fármacos isolados, podendo assim contornar possíveis eventos adversos causados por esses fármacos (KHOEM, 2005). Um típico exemplo de evento adverso associado ao uso de fármacos é o surgimento de úlcera gástrica induzida por anti-inflamatórios não esteroidais. Sabe-se que esse mecanismo ocorre pela diminuição da síntese de prostaglandinas no organismo, resultando na diminuição da proteção da mucosa gástrica contra a secreção gástrica (KUMAR *et al.*, 2005).

A resposta inflamatória aguda ocorre através de diversos eventos, que podem ser classificados como eventos vasculares e eventos celulares (MONTANHER *et al.*, 2007). Os eventos vasculares compreendem vasodilatação arteriolar com aumento da pressão hidrostática na microcirculação, aumento da permeabilidade venular (fenestrações), escape de proteínas com redução da pressão oncótica e edema (exsudato inflamatório). Os eventos celulares estão associados principalmente com migração leucocitária de polimorfonucleares para o tecido inflamado (quimiotaxia). Dentre

os mediadores da resposta inflamatória, podemos citar a histamina (armazenada em mastócitos e basófilos, vasodilatação e aumento da permeabilidade da microcirculação, participação em reações alérgicas), a bradicinina e a substância P. O teste mais comumente utilizado para verificação da ação anti-inflamatória é o edema de pata provocado pela carragenina, que é um modelo agudo de inflamação. Após a administração de carragenina, há migração de neutrófilos e macrófagos para o edema, favorecendo a fagocitose (ESQUISATTO *et al.*, 2001). Uma desvantagem do modelo de carragenina é sua falta de especificidade; são conhecidos fármacos sem ação anti-inflamatória, que diminuem o edema de pata induzido pela carragenina (YSHII *et al.*, 2009).

Estudos conduzidos por nosso grupo de pesquisa (WASICKY, 2007) demonstram atividade anti-inflamatória das duas espécies nativas mais estudadas de *Passiflora*: *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora edulis* Sims. Outros estudos comprovam uma atividade anti-inflamatória significativa com essas mesmas espécies (BENINCA *et al.*, 2007; MONTANHER *et al.*, 2007; VARGAS *et al.*, 2007; ZUCOLOTTI *et al.*, 2009). Neste estudo, verificou-se uma atividade anti-inflamatória pouco pronunciada do extrato bruto de *P. serratodigitata*, que ocorre através de uma redução de edema após cerca de quatro horas do insulto. Tal resultado, associado com a falta de inibição de substâncias pró-inflamatórias (histamina, substância P e bradicinina), sugere uma atividade anti-inflamatória atuando na quimiotaxia de polimorfonucleares (KUMAR, 2005). Vale ressaltar que, nas mesmas doses, a atividade antiúlcera apresentou resultados muito mais significativos que a atividade anti-inflamatória.

O uso de etanol na indução de úlceras ocorre através de procedimentos simples e reprodutíveis, com a administração de diferentes quantidades (0,5 a 2 mL) de etanol concentrado (50-100%). Dependendo da quantidade de etanol administrada, entre 10 e 40% da porção glandular dos estômagos de ratos e camundongos se tornam cobertas por lesões hemorrágicas e úlceras, que são observadas em pouco tempo (entre uma e duas horas) após a administração. Estudos feitos com base no tempo do modelo demonstram que a maior parte das lesões se forma nos primeiros minutos do contato do etanol com a mucosa. Através de estudos histológicos, percebeu-se que o comprometimento do fluxo

sanguíneo tem um papel na etiologia da úlcera induzida por esse modelo, devido às lesões vasculares provocadas pelo etanol (GLAVIN, 1992).

Os mecanismos de aumento da lesão da mucosa gástrica são: geração de radicais livres, refluxo na difusão de ácido, liberação de serotonina e de histamina, efluxo de sódio e potássio, influxo de cálcio, produção de leucotrienos, isquemia e permeabilidade vascular gástrica. Mecanismos de proteção incluem produção de muco, aumento de motilidade gástrica, diferença de potencial transmucosa, produção endógena de glutathione, produção de prostaglandinas e aumento de fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (GLAVIN, 1992). A patogenia da úlcera péptica é complexa, pois ela ocorre após um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa da mucosa gastrointestinal e as forças lesivas, particularmente o ácido gástrico e a pepsina (KUMAR, 2005). Embora a hiperacidez não seja um pré-requisito para o desenvolvimento de úlcera péptica, pois muitos pacientes com tal lesão não apresentam hiperacidez, pode ocorrer ulceração gástrica quando as defesas da mucosa falham, como por exemplo, quando o fluxo sanguíneo da mucosa se reduz, quando há um retardo do esvaziamento gástrico ou impedimento da restituição epitelial (KUMAR, 2005).

Em 2002, REPETTO destacou em sua revisão o papel de espécies reativas de oxigênio na patogênese da úlcera gástrica, inclusive quando essas lesões são ocasionadas por etanol. Atribui-se ao álcool o aumento de ânions superóxido, radicais hidroxila e peroxidação lipídica na mucosa gástrica, induzindo estresse oxidativo intracelular. KWIECIÉN e colaboradores (2002) também encontraram evidências de que as espécies reativas de oxigênio têm participação na etiologia da ulceração causada por etanol. GAZZIERI e colaboradores, em 2007 realizaram um trabalho para colaborar com a elucidação do mecanismo que relacione etanol, radicais livres e lesão gástrica. Com os resultados, foi sugerido que há o envolvimento de canais receptores de potencial transiente vanilóides do tipo 1 (TRPV-1), que ao serem ativados por etanol resultam na liberação de substância P que estimula receptores de neurocinina-1 a gerar espécies reativas de oxigênio. Desse modo, é plausível atribuir a atividade antiúlcera dos compostos estudados à sua capacidade antioxidante.

Resultados anteriores do grupo (WASICKY, 2007), mostraram uma atividade antiúlcera de *P. alata* de 100% de proteção, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg do extrato bruto produzido. No mesmo estudo, o extrato bruto de *P. nitida* apresentou 27%, 74% e 92% de proteção, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, respectivamente. O presente estudo mostrou uma proteção de 72,6%, 75,8% e 75,5%, respectivamente para as doses do extrato bruto de 100, 200 e 400 mg/mL de *P. serratodigitata*. Além disso, a atividade antiúlcera das frações acetato de etila e aquosa residual apresentaram resultados ainda mais satisfatórios, com redução de mais de 90% na dose de 50 mg/kg da fração acetato de etila e acima de 80% na mesma dose para a fração aquosa residual. No entanto, observa-se um atividade antiúlcera dose-dependente apenas na fração aquosa. Os resultados obtidos nas CCD apontaram uma concentração relativamente grande de flavonóides (depois revelada pelo doseamento, ser superior a 10% em massa do extrato bruto e da fração acetato de etila). Em CCD, não foi possível confirmar a presença de taninos, pois o revelador utilizado (cloreto férrico) identifica estruturas polifenólicas, das quais também fazem parte os flavonóides. Pode-se supor que a presença de taninos nas CCD foi mascarada pela grande presença de flavonóides.

Apesar desses resultados satisfatórios, não foi possível associar a atividade antioxidante dos extratos de *P. serratodigitata* com a atividade antiúlcera, uma vez que os resultados mais significativos da atividade antioxidante não correspondem aos resultados mais significativos da atividade antiúlcera. Além disso, não foi observada atividade antiúlcera dose-dependente no extrato bruto e na fração acetato de etila, frações que apresentaram maior concentração de flavonóides.

A falta de dose-dependência encontrada na fração acetato de etila pode corresponder a uma dose eficaz 50% menor que 50 mg/kg. Já a falta de dose-dependência encontrada no extrato bruto pode ser interpretada por diversos fatores, associados à maior complexidade em compostos bioativos desse extrato, particularmente os taninos. Por serem polifenóis não absorvíveis, os taninos podem ter contribuído como proteção local da mucosa gástrica: sua presença dentro do lúmen gástrico impediu a ação do agente ulcerogênico (etanol acidificado), contribuindo para a satisfatória proteção gástrica, embora não tenha produzido um efeito de proteção total, como a fração acetato de

etila. Finalmente, é possível que a atividade antiúlcera possa ser obtida através de um sinergismo entre flavonóides e outros compostos bioativos (alcalóides, por exemplo), o que representa uma limitação deste trabalho, que avaliou principalmente a influência de flavonóides nos parâmetros estudados.

Referente à atividade antioxidante, encontrou-se uma EC_{50} de 102,4 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato bruto de *P. serratodigitata*, 77,3 $\mu\text{g/mL}$ para a fração acetato de etila e 338,4 $\mu\text{g/mL}$ para a fração aquosa residual. Em ensaios anteriores do grupo (WASICKY, 2007) a EC_{50} encontrada foi de 1061,2 $\mu\text{g/mL}$ e 128,0 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos brutos de *P. alata* e *P. nitida* respectivamente, utilizando exatamente o mesmo método. Os resultados encontrados sugerem atividade antioxidante dose-dependente, embora extratos considerados antioxidantes, como os extratos etanólicos de *Pothomorphe umbellata* (parapiroba), apresentem atividade antioxidante com concentrações bem menores de extrato em relação ao Trolox (BARROS, 1996). MENSOR (2001), ao realizar uma triagem da atividade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras, considerou promissoras as espécies com EC_{50} de até 200 $\mu\text{g/mL}$.

No entanto, podemos associar a atividade antioxidante com o teor de flavonóides encontrados nos extratos. O percentual de massa de flavonóides encontrado nos ensaios de quantificação condiz com a atividade antioxidante: o teor de flavonóides no extrato bruto (11,7%) e na fração acetato de etila (10,5%) correspondem aos produtos que apresentaram EC_{50} mais baixo (102,4 e 77, 3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). A atividade antioxidante que possuem certos compostos é de grande valia na prevenção de danos às mucosas, em particular à mucosa gástrica, uma vez que os radicais livres representam um fator importante na formação de lesões ulcerativas e erosivas do trato gastrointestinal. Tanto flavonóides quanto taninos apresentam atividade antioxidante (BORRELLI, 2000). Através da metodologia empregada na CCD, taninos não foram detectados. As bandas reveladas com cloreto férrico identificam compostos fenólicos (tanto taninos quanto flavonóides) e todas as bandas reveladas com esse composto também foram reveladas com a solução NP (específica para flavonóides). Embora não seja um resultado quantitativo, tais resultados indicam que taninos podem estar presentes em baixo teor.

Este trabalho demonstrou a presença de cinco compostos majoritários, cuja varredura em ultravioleta aponta para estrutura flavonoídica. Desses compostos, através do fracionamento realizado, foram segregados apenas dois deles em frações específicas. Os outros foram segregados em duas frações diferentes do extrato bruto original (diclorometano e acetato de etila, ou acetato de etila e aquosa). Não obstante, foi possível isolar e identificar um destes compostos, presentes tanto na fração acetato de etila (pico 1 da figura 9) quanto na fração aquosa (pico 4 da figura 10).

O isolamento e identificação de uma das substâncias majoritárias revelaram uma espécie rara de flavonóide, um neoflavonóide. Junto com isoflavonas e isoflavonas, neoflavonóides possuem a estrutura C6-C3-C6, embora o anel B encontra-se em diferentes posições no heterociclo oxigenado (VERMERRIS & NICHOLSON, 2006). A estrutura foi identificada como 5-glico-7-metil-4-fenil-4a,8a-di-idrocromen-2-ona. Dos escassos relatos sobre a espécie estudada nesse trabalho, ULUBELEN e colaboradores identificaram, em 1982, uma estrutura semelhante, denominada de serratina (ULUBELEN *et al.*, 1982). De acordo com a identificação por RMN, a proposta da estrutura isolada por nosso grupo difere da publicada em 1982, com o resíduo de glicose ligado na posição 5 e não 7. Os principais argumentos que sustentam essa idéia são a rotação restrita do anel fenílico (impedimento estérico) observado nos espectros de ^1H e ^{13}C , além do deslocamento anormal do H-2 da glicose em campo protegido pelo anel fenílico. A estrutura deste neoflavonóide isolado assemelha-se muito à estrutura de 4-fenilcumarinas, conhecidos agentes anticoagulantes (BRUNETON, 1999). Talvez essa semelhança estrutural possa contribuir para a marcada atividade antiúlcera apresentada neste trabalho.

A utilização de nanopartículas nas formulações farmacêuticas vem crescendo ao longo dos anos (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010), e isso se explica pelos vários resultados positivos associados principalmente a aumento de biodisponibilidade de substâncias, elaboração de formulações de liberação modificada (NASSAR *et al.*, 2009) e redução de dose, além de demonstrarem relativa segurança em sua utilização (HUREAUX *et al.*, 2001). A grande maioria dos estudos avalia fármacos com baixa biodisponibilidade oral, tais como oligopeptídeos (insulina, calcitonina, octreotida), esteróides (progesterona, estradiol) e agentes utilizados em terapia genética. As formulações

nanoparticuladas apresentam inúmeras vantagens sobre outros tipos de formulações, a saber: redução de dose, possibilidade de administração por via intravenosa sem produção de embolia, aumento de estabilidade da formulação e conservação do ativo, possibilitando a administração por via oral (HUREAUX *et al.*, 2001)

Existem pouquíssimos relatos sobre a tentativa de encapsulamento de matrizes complexas, tais como extratos de plantas medicinais. Um estudo avaliou a influência do encapsulamento de extrato etanólico de sementes de *Cuscuta chinensis* Lam. Os autores verificaram a formação de uma nanopartícula que possuía uma atividade hepatoprotetora cinco vezes maior em determinada concentração, quando comparada com a atividade do extrato etanólico não encapsulado (YEN *et al.*, 2008).

A caracterização das nanopartículas formuladas neste trabalho foi satisfatória. Tanto a nanopartícula de origem (branca) quanto as nanopartículas às quais foram incorporados ativos apresentaram tamanho de partícula na escala nanométrica, distribuição de tamanho de partícula de forma unimodal (equação gaussiana), e potencial Zeta diferente de zero. Com isso, as nanopartículas formadas apresentam as vantagens de sistemas nanoparticulados citados anteriormente. O potencial Zeta determina a carga superficial da nanopartícula (NASSAR *et al.* 2009). Verificou-se que a incorporação dos ativos aumenta consideravelmente o tamanho da nanopartícula e aproxima o potencial Zeta do zero. Isso pode ser explicado, pois o ativo pode estar inserido dentro da matriz polimérica, o que torna a superfície da mesma não uniforme.

Este estudo demonstrou atividade antiúlcera mais pronunciada com o extrato bruto encapsulado de *P. serratodigitata*. Quando comparada a dose, verificou-se atividade antiúlcera da formulação nanoencapsulada semelhante à atividade da formulação não nanoencapsulada, em doses dez vezes menores. Tal fato pode ser justificado pela proteção dos compostos bioativos dentro da nanocápsula, o que permite uma passagem de maior quantidade desses compostos pelo estômago; e pela liberação relativamente mais lenta do ativo em relação ao produto não encapsulado, o que provocaria uma absorção maior.

Verificou-se nos dois ensaios realizados atividade antiúlcera significativamente distinta das nanopartículas brancas (nas quais não houve incorporação do extrato ou da fração) em relação ao controle negativo. Esse efeito poderia acontecer devido à presença do polímero utilizado na formulação. A poli(ϵ -caprolactona) é um polímero de carga superficial negativa, o que provavelmente reduz o pH do meio estomacal. Como o ensaio de atividade antiúlcera escolhido é um ensaio agudo, provavelmente a influência da redução de carga e conseqüente aumento do pH do estômago é grande, sendo que o tempo entre a administração dos produtos e a eutanásia dos animais não permite ao organismo compensar o pH estomacal.

Este trabalho alcançou os objetivos inicialmente propostos, indo além graças ao isolamento e elucidação estrutural de um composto bioativo presente em grande quantidade. No entanto, é necessário explorar mais a atividade antiúlcera de folhas e caules de *Passiflora serratodigitata* L., através de ensaios animais de padrão crônico; verificar a contribuição de outros compostos bioativos na atividade antiúlcera; e compreender o mecanismo de ação que tornou as frações nanoencapsuladas mais ativas do que as frações reconstituídas em água. Para a população, este trabalho demonstrou que existe um grande potencial terapêutico em uma espécie vegetal pouco estudada. É provável que muitas espécies vegetais nativas possam ser cultivadas para o desenvolvimento de fitoterápicos obtidos de biomas em extinção, como é o caso da Mata Atlântica.

CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu caracterizar de forma satisfatória a fitoquímica e algumas atividades farmacológicas do extrato bruto produzido a partir de folhas e caules de *Passiflora serratodigitata* L., além de permitir a comprovação de eficácia da formulação nanoencapsulada. As principais conclusões estão listadas a seguir:

- Os principais grupos químicos de interesse farmacológico presentes tanto na droga vegetal quanto no extrato bruto produzido em laboratório são alcalóides, flavonóides e taninos. Não foram encontradas saponinas ou antraquinonas.
- O perfil cromatográfico em CCD acusou uma banda bastante intensa, localizada principalmente na fração acetato de etila, sugerindo a presença de compostos fenólicos. O perfil cromatográfico em CLAE sugere a presença de cinco flavonóides majoritários, sendo a maior quantidade nas frações acetato de etila e aquosa.
- Flavonóides foram quantificados no extrato bruto (12% m/m), na fração acetato de etila (10% m/m) e na fração aquosa (3% m/m), dados que corroboram o encontrado nas cromatografias. Das frações acetato de etila e aquosa foi isolado um neoflavonóide, anteriormente nomeado de serratina (flavonóide em maior quantidade), a 5-glico-7-metil-4-fenil-4a,8a-di-idrocromen-2-ona. A proposta de estrutura química diverge da encontrada na literatura.
- Nanopartículas foram obtidas a partir do extrato bruto e da fração acetato de etila. A metodologia utilizada permitiu a formação de partículas com diâmetro de cerca de 400 nm, potencial Zeta entre -20 e -30 mV, e eficiência de encapsulamento superior a 75%.
- O extrato bruto e as frações acetato de etila e aquosa de *P.serratodigitata* apresentaram atividade antiúlcera, com doses variando de 50 a 400 mg/kg. Todas as doses apresentaram proteção da mucosa

gástrica acima de 50%. Para o extrato bruto, não houve atividade anti-inflamatória significativa nas doses de 100 a 400 mg/kg.

- Encontrou-se relação dose efeito apenas na fração aquosa. A fração acetato de etila não apresentou relação dose-efeito, pois as doses foram superiores a este patamar. O extrato bruto sofreu interferência dos taninos presentes, que apresentaram proteção local da mucosa gástrica.
- A atividade antioxidante apresentou-se dose-dependente tanto para o extrato quanto para as frações acetato de etila e aquosa. A concentração eficaz 50% foi menor no extrato bruto e na fração acetato de etila (80 e 100 mcg/mL, respectivamente), condizente com o resultado da quantificação de flavonóides.
- A formulação nanoparticulada do extrato bruto de *P.serratodigitata* apresentou maior proteção da mucosa gástrica quando comparada na mesma dose, e da fração acetato de etila, atividade semelhante, quando comparada em dose dez vezes menor. A nanopartícula branca (sem incorporação do extrato) também apresentou atividade gastroprotetora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOURASHED, E.A.; VANDERPLANCK, J.R.; KHAN, I.A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants. II. Application to harman alkaloids of genus *Passiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 100-106, 2003.
2. AKHONDZADEH, S.; NAGHAVI, H.R.; VAZIRIAN, M.; SHAYEGANPOUR, A.; RASHIDI, H.; KHANI, M.; Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 26, p. 363-367, 2001.
3. AOYAGI, N.; KIMURA, R.; MURATA, T. *Passiflora incarnata* dry extract. I. Isolation of maltol and pharmacological action of maltol and ethyl maltol. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, p. 1008-1013, 1974.
4. ARAÚJO, T.A.S.; ALENCAR, N.L.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 72-80, 2008.
5. BABENKO, N.A.; SHAKHOVA, E.G. Effect of flavonoids on sphingolipid turnover in the toxin-damaged liver and liver cells. **Lipids in Health and Disease**, v.7, 1, 2008.
6. BALBACHAS, A. **As plantas curam**. 6. ed. São Paulo: Editora Missionária "A Verdade Presente", 1957. 432p.
7. BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p.431-441, 2005.
8. BARROS, S.B.M.; TEIXEIRA, D.S.; AZNAR, A.E.; MOREIRA Jr., J.A.; ISHII, I.; FREITAS, P.C.D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. Miq. (pariparoba). **Ciência e Cultura**, v.48, p.114-116, 1996.

9. BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. LTC/EDUSP, Rio de Janeiro/São Paulo. v.1, 1986. p. 194.
10. BASHA, S.K.C.; RAJ, D.B.; SWAMY, S.B.; REDDY, M.J.; GOUDA, T.S. Evaluation of analgesic activity of hydro alcoholic leaf extract of *Passiflora foetida*. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 40, f. 2, p. s75, 2008.
11. BECK, R.C.R; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, f. 5, p. 499-512, 2004.
12. BENINCA, J.P.; MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTO, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, T.S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1097-1105, 2007.
13. BERNACCI, L.C. Passifloraceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa/FAPESP, v. 3, p. 247-248, 2003.
14. BEZERRA, J.L.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; CARVALHO, I.C.D.S.; PATRÍCIO, F.J.; SOUSA, S.M.; AMARAL, F.M.M.; REBELO, J.M.M.; GUERRA, R.N.M; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 631-637, 2006.
15. BOKSTALLER, S.; SCHMIDT, P.C. A comparative study on the content of passionflower flavonoids and sesquiterpenes from valerian root extracts in pharmaceutical preparations by HPLC. **Pharmazie**, v. 52, p. 552-557, 1997.
16. BORGATTI, G. Pharmacodynamic studies on *Passiflora incarnata* L. **Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale**, v. 14, p. 203-205, 1939.

17. BORRELLI, F.; PINTO, L.; IZZO, A.A.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F.; MERCATI, V.; TOJA, E.; AUTORE, G. Anti-inflammatory activity of *Passiflora incarnata* L. in rats. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. S104-106, 1996.

18. BRUNETON, J. **Pharmacognosy: Phytochemistry, Medicinal Plants**. 2^a Ed. Paris: Lavoisier Publishing, 1999. Parte 2, cap. 6, pp. 331-335.

19. CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 75, p. 501-512, 2003.

20. CARRASCO, M.C.; VALLEJO, J.R.; PARDO-DE-SANTAYANA, M.; PERAL, D.; MARTIN, M.; ALTIMIRAS, J. Interaction of *Valeriana officinalis* L. and *Passiflora incarnata* L. in a patient treated with lorazepam. **Phytotherapy Research**, v. 23, f. 12, p. 1795-1796, 2009

21. CHAUDHRY, H.R.; TAJ, R.; SAEED, N.; KHAN, N.H.; CHAUDARY, A.; LOONEN, A.J.M. Effectiveness of a combination of Hypericum and Passiflora for the treatment of depression with concomitant anxiety, **European Neuropsychopharmacology**, v. 17, p. S394-S394, 2007.

22. COPPENS D'EECKENDRUGGE, G.; Exploração da diversidade genética das Passifloras. VI Simpósio Brasileiro sobre a Cultura do Maracujazeiro. Campos dos Goytacazes; UENF/UFRRJ. 25p. 2003.

23. CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. v. 5, p. 108, 1984.

24. DAVID, J.P.; MEIRA, M.; DAVID, J.M.; BRANDÃO, H.N.; BRANCO, A.; AGRA, M.F.; BARBOSA, M.R.V.; QUEIROZ, L.P.; GIULIETTI, A.M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 212-215, 2007.

25. DAMGÉ, C.; SOCHA, M.; UBRICH, N.; MAINCENT, P. Poly(ϵ -Caprolactone)/ Eudragit nanoparticles for oral delivery of aspart-insulin in the treatment of diabetes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n.2, p. 879-889, 2010.
26. DERMARDEROSIAN, A., BEUTLER, J.A. (eds.) **The Review of Natural Products**. Saint Louis: Facts and Comparisons, 2002.
27. DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Aphrodisiac activity of methanol extract of leaves of *Passiflora incarnata* Linn. in mice. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 401-403, 2003.
28. DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Antiasthmatic activity of the methanol extract os leaves of *Passiflora incarnata*. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 821-822, 2003.
29. DHAWAN, K.; SHARMA, A. Antitussive activity of methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves. **Fitoterapia**, v. 73, p. 397-399, 2002.
30. DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 1-23, 2004.
31. DOYAMA, J.T.; RODRIGUES, H.G.; NOVELLI, E.L.B.; CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 371-374, 2005.
32. DUKE, J.A. **Handbook of medicinal herbs**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2002. 870p.
33. ESQUISATTO, L.C.M.; COSTA, S.K.P.; CAMARGO, E.A.; RIBELA, M.T.C.P.; BRAIN, S.D.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. The plasma protein extravasation induced by adenosine and its analogues in the rat dorsal skin: evidence for the involvement of capsaicin sensitive primary afferent neurons

and mast cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, p. 108-115, 2001.

34. FARMACOPÉIA Brasileira. 2ª Edição. Preparo de material vegetal. 1959.

35. FARNSWORTH, N.R. Biological and phytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.55, f.3, p.225-276, 1966.

36. FELLOWS, E.J.; SMITH, C.S. The chemistry of *Passiflora incarnata*. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 27, p. 574-576, 1938.

37. FISHER, A.A.; PURCELL, P.; LE COUTER, D.G. Toxicity of *Passiflora incarnata* L. **Clinical Toxicology**, v. 38, f. 1, p. 63-66, 2000.

38. FREITAS, M.S.M.; **Flavonóides e nutrientes minerais em folhas de maracujazeiro amarelo e deficiência de macronutrientes e boro em maracujazeiro doce**. Campos dos Goytacazes, 2006. 119 p. Dissertação de Doutorado – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – Universidade Estadual do Norte Fluminense.

39. FREITAS, P.C.D. **Estudo farmacognóstico comparativo de espécies brasileiras do gênero *Passiflora* L.** São Paulo, 1985. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

40. GARCIA, A.A. **Fitoterapia: Vademécum de Prescripción**. 3. ed. Barcelona: Masson, 2000. 1148p.

41. GAZZIERI, D.; TREVISANI, M.; SPRINGER, J.; HARRISON, S.; COTTREL, G.S.; ANDRE, E.; NICOLETTI, P.; MASSI, D.; ZECCHI, S.; NOSI, D.; SANTUCCI, M.; GERARD, N.P.; LUCATTELLI, M.; LUNGARELLA, G.; FISCHER, A.; GRADY, E.F.; BUNNETT, N.W.; GEPPETTI, P. Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species

that mediate ethanol-induced gastric injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.581-589, 2007.

42. GLAVIN, G.B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **The FASEB Journal**, v.6, p.825-831, 1992.
43. GOMES, C.S.; CAMPOS, A.C.L.; TORRES, O.J.M.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, A.T.R.; TENÓRIO, S.B.; TÂMBARA, E.M.; SAKATA, K.; MORAES, H.J.; FERRER, A.L.S. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, f. 2, p 9-16, 2006.
44. GONÇALVES FILHO, A.; TORRES, O.J.M.; CAMPOS, A.C.L.; TÂMBARA FILHO, A.; ROCHA, L.C.A.; THIEDE, A.; LUNEDO, S.M.C.; BARBOA, R.E.A.; BERNHARDT, J.A.; VASCONCELOS, P.R.L. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) na cicatrização de bexiga em ratos: estudo morfológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, f. 2, p. 3-8, 2006.
45. GONZALEZ, F.G.; PORTELA, T.Y.; STIPP, E.J.; DI STASI, L.C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*, **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p. 41-47, 2001.
46. GRIEVE, M.; LEYEL, C. F. **A modern herbal**. London: Tiger Books International, 1994.
47. HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen**. Basel, Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1990.
48. HUREAUX, J.; LAGARCE, F.; GAGNADOUX, F.; ROUSSELET, M.C.; MOAL, V.; URBAN, T.; BENOIT J.P. Toxicological study and efficacy of blank and placitaxel-loaded lipid nanocapsules after i.v. administration in mice. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 3, p. 421-430, 2009.

49. ICHIMURA, T.; YAMANAKA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneous hypertensive rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, f. 3, p. 718-721, 2006.

50. JUDD, W.S. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 1999. 464p.

51. KOHEN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, p.206-220, 2005.

52. KRESS, W.J.; HEYER, W.R.; ACEVEDO, P.; CODDINGTON, J.; COLE, D.; ERWIN, T.L.; MEGGERS, B.J.; POGUE, M.; THORINGTON, R.W.; VARI, R.P.; WEITZMAN, M.J.; WEITZMAN, H. Amazonian biodiversity: assessing conservation priorities with taxonomic data. **Biodiversity and Conservation**, v. 7, p. 1577-1587, 1998.

53. KRUGER, A. **Herbs: their medicine and magic**. London: Parkgate Books, 1992.

54. KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; **Robbins e Cotran: Patologia – Bases patológicas das doenças**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. Cap. 17, p 857-862.

55. KWIECIEŃ, S.; BRZOSOWSKI, T.; KONTUREK, S.J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.53, n.1, p.39-50, 2002.

56. LI, J.; LI, W.Z.M; HUANG W.; CHEUNG, A.W.H; BI, C.W.C; DUAN, R.; GUO, A.J.Y; DONG, T.T.X; TSIM, K.W.K. Quality evaluation of rhizoma belancamdae (*Belancamda chinensis* (L.) DC.) by using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass

spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 12.16, p. 2071-2018, 2009.

57. LUTOMSKI, J. Qualitative and quantitative chromatographic investigations of alkaloids of *Passiflora incarnata*. **Biuletyn Instytutu Roslin Lecznicznych**, v. 5, p. 182-198, 1959.
58. LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmacochemical investigations on raw materials genus *Passiflora*. 3. Phytochemical investigations on raw materials of *Passiflora edulis* forma *flavicarpa*. **Planta Medica**, v. 27, p. 222-225, 1975.
59. MAHADY, G.B.; PENDLAND, S.L.; STOIA, A.; HAMILL, F.A.; FABRICANT, D.; DIETZ, B.M.; CHADWICK, L.R. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 988-991, 2005.
60. MAHADI, G.B.; PENDLAND, S.L.; STOIA, A.; HAMILL, F.A.; FABRICANT, D.; DIETZ, B.M.; CHADWICK, L.R. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders, **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 988-991, 2005.
61. MAHMMOUD, Y.A. Modulation of protein kinase C by curcumin; inhibition and activation switched by calcium ions. **British Journal of Pharmacology**, 150; 200-208, 2007.
62. MALUF, E.; BARROS, H.M.T.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BENTI, R.; LEITE, J.R. Assessment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. **Phytotherapy Research**, v. 5, p. 262-266, 1991.

63. MATOS, F. J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Universidade do Ceará, 1988. p.126.
64. McGUIRE, W.P. The story of taxol. **Science**, v. 292.5519, p. 1073, 2001.
65. MEDEIROS, J.S.; DINIZ, M.F.F.M; SRUR, A.U.O.S; PESSOA, M.B.; CARDOSO, M.A.A.; CARVALHO, D.F. Ensaio toxicológicos clínicos da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*) como alimento com propriedade de saúde. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, f. 2A, p. 394-399, 2009.
66. MEDEIROS, R.; PASSOS, G.F.; VITOR, C.E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T.L.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 618-627, 2007.
67. MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, pp.127-130, 2001.
68. MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats. **Japan Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 939-945, 1983.
69. MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTO, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 281-288, 2007.
70. MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.385, p. 113-142, 2010.

71. MORAES, M.L.L. **Extração e análise de flavonóides em espécies brasileiras de *Passiflora* L.** São Carlos, 1995. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo.
72. MORELLATO, L.P.C.; HADDAD, C.F.B. Introduction: the brazilian Atlantic forest. **Biotropica**, v. 32, f. 4b, p. 786-792, 2000.
73. MOVAFEGH, A.; ALIZADEH, R.; HAJIMOHAMADI, F.; ESFEHANI, F.; NEJATFAR, M. Preoperative oral *Passiflora incarnata* reduces anxiety in ambulatory surgery patients: a double-blind, placebo-controlled study, **Anesthesia and Analgesia**, v. 106, f. 6, p 1728-1732, 2008 *apud* ISI Web of Knowledge ISSN: 0003-2999.
74. MÜLLER, S.D.; VASCONCELOS, S.B.; COELHO, M.; BIAVATTI M.W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 399-403, 2005.
75. MÜLLER, V.; CHÁVEZ, J.H.; REGINATTO, F.H.; ZUCOLOTTI, S.M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, R.A.; SCHENKEL, E.P.; BARARDI, C.R.M.; ZANETTI, C.R.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of antiviral activity of south American plant extracts against Herpes simplex virus type 1 and rabies virus, **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 970-974, 2007.
76. NASCIMENTO, D.F.; SANTANA, A.P.M.; LEITE, I.O.; VIANA, F.A.C.; LEITE, A.L.A.S.; MORAES, R.A.; JAMACARU, F.V.F.; BEZERRA, F.A.F.; MORAES, M.O.; MORAES, M.E.A. Estudo da toxicologia clínica de um fitoterápico contendo *Passiflora incarnata* L., *Crataegus oxyacantha* L. e *Salix alba* L. em voluntários sadios. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, f. 1B, p. 261-268, 2009.
77. NASSAR, T.; ROM, A.; NYSKA, A.; BENITA, S. Novel Double coated nanocapsules for intestinal delivery and enhanced oral bioavailability of

tacrolimus, a P-gp substrate drug. **Journal of Controlled Release**, v. 133, p. 77-84, 2009

78. NASSIRI-ALS, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, F. Anticonvulsant effect of aerial parts of *Passiflora incarnata* extracts in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, f. 26, 2007.
79. NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.
80. OGA, S., FREITAS, P.C., GOMES DA SILVA, A.C., HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *P. alata*. **Planta Medica**, v.50, f.4, p.303-306, 1984.
81. OLIVEIRA, L.F.; NASCIMENTO, M.R.F.; BORGES, S.V.; RIBEIRO, P.C.N., RUBACK, V.R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, pp. 259–262, 2002.
82. PEREIRA, C.A.M.; VILEGAS, J.H.Y. Constituintes Químicos e Farmacologia do Gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander., *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 3, f. 1, p 1-12, 2000.
83. PETRY, R.D.; REGINATTO, F.; DE-PARIS, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G.G.; SCHENKEL, E.P. Comparative pharmacological study on hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 162-164, 2001.

84. PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIÈS, M.A.; BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nature reviews: drug discovery**, v. 4, p. 727-740, 2005.
85. PLOTZE, R.O.; FALVO, M.; PADUA, J.G.; BERNACCI, L.C.; VIEIRA, M.L.C.; OLIVEIRA, G.C.X.; BRUNO, O.M. Leaf shape analysis using the multiscale Minkowski fractal dimension, a new morphometric method: a study with *Passiflora* (Passifloraceae). **Canadian Journal of Botany**, v. 83, p. 287-301, 2005.
86. POZZI, A.C.S. **Desenvolvimento de Métodos de Análise Espectrofotométrica de Flavonóides do “Maracujá”**. Tese de Mestrado – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo – 2007.
87. PRABHAKAR, M.C.; BANO, H.; KUMAR, I.; SHAMSI, M.A.; KHAN, S.I. Pharmacological investigations on vitexin. **Planta Medica**, v.43, f.12, p.396-403, 1981.
88. PURICELLI, L.; DELL’AICA, I.; SARTOR, L.; GARBISA, S.; CANIATO, R. Preliminary evaluation of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. **Fitoterapia**, v. 74, pp. 302-304, 2003.
89. RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230, 1997
90. REHWALD, A.; **Analytical investigation of Crataegus species and *Passiflora incarnata* L. by high performance liquid chromatography**. Zurich, 1995. Dissertação de Doutorado – Swiss Federal Institute of Technology. Suíça.
91. REGINATTO, F.; KAUFFMAN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GOSMANN G.; SCHENKEL, E.P. Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of

Passiflora alata, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 195-197, 2004.

92. REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.523-534, 2002.
93. RIPA, F.A.; HAQUE, M.; NAHAR, L.; ISLAM, M.M. Antibacterial, cytotoxic and antioxidant activity of *Passiflora edulis* Sims. **European Journal of Scientific Research**, v. 31, f. 4, p. 592-598, 2009.
94. ROJAS, J.; RONCEROS, S.; PALOMINO, R.; TOMÁS, G.; CHENGUAYEN, J. Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis* (maracuyá), en ratas. **Anales de La Facultad de Medicina de Lima**, v. 67, f. 3, p. 206-213, 2006.
95. ROMMELSPACHER, H.; NANZ, C.; BORBE, H.O.; FEHSKE, K.J.; MÜLLER, W.E.; WOLLERT, U. 1-Methyl-beta-carboline (harmane), a potent endogenous inhibitor of benzodiazepine receptor-binding. **Naunyn-Schmiedenberg's Archives of Pharmacology**, v. 314, p. 97-100, 1980.
96. RUDNICKI, M.; OLIVEIRA, M.R.; PEREIRA, T.V.; REGINATTO, F.H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v.100, p. 719-724, 2007-1-.
97. RUDNICKI, M.; SILVEIRA, M.M.; PEREIRA, T.V.; OLIVEIRA, M.R.; REGINATTO, F.H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F.; Protective effects of *Passiflora alata* extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 656-661, 2007-2-.

98. RUGGY, G.H.; SMITH, C.S. A pharmacological study of the active principle of *Passiflora incarnata*. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 29, p. 245-249, 1940.
99. SACCO, J.C. Passifloráceas. **Flora ilustrada catarinense**. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 1980. 132p.
100. SANTOS, K.C.; SANTOS, C.A.M.; OLIVEIRA, R.M.W. *Passiflora actinia* Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 306-309, 2005.
101. SAUL, C.; TEIXEIRA, C.R.; PEREIRA-LIMA, J.C.; TORRESINI, R.J.S. Redução da prevalência de úlcera duodenal: um estudo brasileiro (análise retrospectiva na última década: 1995-2005), **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 44, f. 4, p 320-325, 2007.
102. SCAVONE, O.; PANIZZA, S. Aspectos botânicos e medicinais de plantas usadas como tranquilizante, destacando-se as nativas do Brasil. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v. 18, p. 185-197, 1978.
103. SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S.S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersions. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 501-505, 2003.
104. SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.A.; THEODULOZ, C.; ASTUDILLO, S.L.; FERESIN, G.E.; TAPIA, A. Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). **Free Radical Research**, v. 37, f. 4, pp. 447-452, 2003.

105. SHI, C.C.; CHEN, S.Y.; WANG, G.J.; LIAO, J.F.; VHEN, C.F. Vasorelaxant effect of harman. **European Journal of Pharmacology**, v. 390, p. 319-325, 2000.
106. SOUZA, K.C.B. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa***. Porto Alegre, 1997. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
107. SOUZA, K.C.B.; ORTEGA, G.G. Padronização e estudo preliminar da estabilidade de extratos hidroalcoólicos de *Passiflora edulis* Sims. (maracujá). **Caderno de Farmácia**, v. 13, p. 147-148, 1997.
108. SOULIMANI, R; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, p. 11-20, 1997.
109. SPERONI, E.; MINGHETTI, A. Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*. **Planta Medica**, v. 54, n. 6, p. 488-91, 1988.
110. SUNG, J.J.Y.; KUIPERS, E.J.; EL-SERAG, H.B. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.29, p.938-946, 2009.
111. SUNITHA, M.; DEVAKI, K. Antioxidant activity of *Passiflora edulis* Sims leaves. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 71, f. 3, p. 310-311, 2009.
112. TABACH, R.; RODRIGUES, E.; CARLINI, E.A. Preclinical toxicological assessment of a phytotherapeutic product – CPV (based on dry extracts of *Crataegus oxyacantha* L., *Passiflora incarnata* L. and *Valeriana officinalis* L.). **Phytoterapy Research**, v. 23, p. 33-40, 2009.

113. ULUBELEN, A.; OKSUZ, S.; MABRY, T.J. C-glucosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *Passiflora alata*, *Passiflora ambigua* and *Adenia mannii*. **Journal of Natural Products**, v. 45, p. 783, 1982.
114. VARGAS, A.J.; GEREMIAS, D.S.; PROVENSI, G.; FORNARI, P.E.; REGINATTO F.H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, T.S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, p. 112-117, 2007.
115. VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic Compounds Biochemistry**. 1a Ed, Dordrecht: Springer, 2006. 276 p.
116. WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2a Ed. Berlin, London: Springer-Verlag, 1996. 384p.
117. WASICKY, A. **Estudo farmacognóstico comparativo de *Passiflora alata* Curtis e *P. nitida* (Passifloraceae). Avaliação das atividades antiúlcera e antioxidante de seus extratos**. São Paulo, 2007. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
118. WHEATLEY, D. Medicinal plants for insomnia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. **Journal of Psychopharmacology**, v. 19, f. 4, p. 414-421, 2005.
119. WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; PALADINI, A.; DAJAS, F.; MEDINA, J.H. Possible anxiolytic effects of chrysin, as central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora caerulea*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 47, p. 1-4, 1994.
120. YEN, L.F.; WU, T.H.; LIN, L.T.; CHAM, T.M.; LIN, C.C. Nanoparticles formulation of *Cuscuta chinensis* prevents acetaminophen-induced

hepatotoxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1771-1777, 2008.

121. YSHII, L.M.; SOUZA, G.H.M.F.; CAMARGO, E.A.; EBERLIN, M.N., RIBELA, M.T.C.P.; MUSCARA, M.N.; HYSLOP, S.; COSTA, S.K.P. Characterization of the mechanism underlying the inflammatory response to *Polistes lanio lanio* (paper wasp) venom in mouse dorsal skin. **Toxicon**, v. 53, p.42-52, 2009.
122. ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Behavioural characterization of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**, v. 71, p. S117-123, 2000.
123. ZIBADI, S.; FARID, R.; MORIGUCHI, S.; LU, Y.; FOO, L.Y.; TEHRANI, P.M.; ULREICH, J.B.; WATSON, R.R. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneous hypertensive rats and humans. **Nutrition Research**, v. 27, p. 408-416, 2007.
124. ZUCOLOTTO, S.M.; GOULART, S.; MONTANHER, A.B.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, S.S. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**, v. 75, p. 1221-1226, 2009.